



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

**APOPTOSIS MEDIANTE ESPECIES REACTIVAS DE
OXIGENO EN EL NEUROBLASTOMA, POR EFECTO DE
CASIOPEÍNAS®**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Q.F.B. ANLLELY GRIZETT GUTIERREZ RODRIGUEZ

Tutora: **DRA. MARIA DEL CARMEN MEJIA VAZQUEZ**
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

Comité tutor: **DR. JOSE PEDRAZA CHAVERRI,**
FACULTAD DE QUIMICA

DRA. GOAR GERVORGYAN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

MÉXICO, D. F. SEPTIEMBRE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado con los proyectos PAPIIT-UNAM 204511 y PICSA10-61 (Instituto de Ciencia y Tecnología del D.F.). y la beca que CONACYT me otorgo.

“Porque toda la gloria, la honra y la alabanza solo pertenecen a ti, arrojé esta corona delante de tu presencia declarando que todo lo que soy y lo que seré lo debo solo a mi amado salvador, y que la culminación de este trabajo no se debió a mi sabiduría o a mis fuerzas, sino a tus muchas misericordias, gracias poderoso Dios”

Dra. Carmen Mejía muchas gracias por aceptarme para realizar este proyecto bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo, su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación profesional. Las ideas propias, siempre enmarcadas en su orientación, han sido la clave del buen trabajo que hemos realizado juntas, el cual no se puede concebir sin su oportuna participación. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis, por su total comprensión e incluso abrirme las puertas de su casa !!!Muchas gracias!!!

Los miembros del comité tutor el **Dr. José Pedraza** y la **Dra. Gohar Gervokian** gracias por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis. Debo destacar, que su disponibilidad y paciencia han enriquecido el trabajo realizado.

Los miembros del jurado **Dra. Chagoya**, **Dr. Uribe**, **Dra Rocha**, **Dra Ma. Antonieta**, gracias por el tiempo que han dedicado para leer este trabajo, sus observaciones e indicaciones fueron una gran aportación en la culminación de este proyecto.



Dra. Lena Ruiz muchas gracias por tener un corazón siempre dispuesto a ayudar, porque teníamos la certeza de que cualquier dificultad o conflicto podíamos acercarnos a usted y encontraríamos apoyo; su experiencia y consejo fueron un gran aporte durante este proyecto.

Se agradece el apoyo y la asesoría técnica-metodológica ofrecida por el **Biólogo Experimental Gonzalo Acero Galindo** durante la realización de este proyecto.

Dr. Jonny muchas gracias por siempre llenar el laboratorio de risas, krankys y gomitas, tus comentarios, consejos y apoyo fueron claves para la realización de este trabajo. **Dra. María Elena** gracias por su apoyo en la síntesis de Casiopeínas y sus consejos durante desarrollo de este proyecto.

Mis padres **Pedro Antonio Gutiérrez** y **Griselda Rodríguez** que son el instrumento que Dios uso para que yo fuera concebida en esta tierra, porque su manera de vivir ha sido mi ejemplo para llevar una vida conforme a la voluntad de Dios, me han enseñado a establecer mis pasos en Jesús y a depender de él en mi diario vivir. Le doy gracias a Dios por sus vidas, por su paciencia, su amor, su apoyo incondicional, sus desveladas, sus preocupaciones, sus oraciones y sus consejos que hoy están atesorados en mi corazón, declaro toda bendición sobre sus vidas, y que alcanzaran el propósito que Dios tiene para ustedes,
!!! LOS AMOOO!!!.

No podría ser más bendecida con los hermanos que Dios me dio **Tony** y **Gibran**, mis grandes amigos de juegos, risas, historias, momentos; con los que eh compartido cada etapa de mi vida. Dios me ha permitido ver cómo han crecido física y espiritualmente; me llena de gozo observar como son instrumentos para establecer su reino. De ambos eh aprendido tanto, gracias por todos sus consejos (aun aquellos que me dieron sin hablar), estoy muy orgullosa de los hombres en los que se han convertido, de la madurez con la que toman decisiones, de sus profesiones, de su manera de ser; no me alcanzan las palabras para agradecerle a Dios que los haya puesto a mi lado, mi vida no sería la misma sin ustedes, sean benditos de mi Padre, hijos de la diestra y esposa de Cristo en el nombre de Jesús
!!! LOS AMOOO!!!.



A mi amado esposo **Said Marín**, Dios me bendijo con tu vida como respuesta a mis oraciones, eres un hombre que por sobretodo honra a Dios, que tiene un corazón dispuesto a obedecer sus mandatos y a dejarse guiar conforme a su voluntad, admiro la obra y el ministro que Dios ha formado en ti; gracias por todas las ocasiones que amenizabas los largos tiempos de incubación con esas buenas platicas, porque siempre me sentí apoyada por tus consejos, tus oraciones, y tu interés por entender a mis vúlgaros jajajaja; TE AMO!!!!

A mis grandes compañeros y amigos del laboratorio **Luis** (!!amigo!!, tienes un corazón enorme, siempre dispuesto a dar, gracias por todo!!), **Rafa** (así o más molesto jajaja, gracias por todas las risas y las carlotas), **Paquito** (mi profesor de citómetro favorito), **Rox** (siempre recibiéndonos con una sonrisa y toda la actitud), **Yess** (compañera de lágrimas y risas en las películas de amor), **Marisol** (peluquitas, una corredora incansable, no solo en el deporte, también en tu diario vivir), **Dulce** (tu sarcasmo e ironía ponía el toque final a las buenas platicas) ; su apoyo ha sido invaluable, gracias por su cariño, por tantas y tantas risas que no solo hacían cada momento ameno y ligero, si no que cada uno de ellos se han convertido en grandes recuerdos en mi corazón, los quiero mucho.

Adri, Gracias por todo este tiempo, tu apoyo y comprensión han sido incondicionales, eres una gran mujer, agradezco a Dios que nos haya enlazado, tu paciencia, alegría, entusiasmo y compañía han sido fundamentales !!! todo comenzó con un proyecto juntas y gane una amistad para siempre, Gracias por todo amiga!!!, Te quiero mucho.

Dr. Gonzalo Acero, gracias por estar siempre dispuesto a ayudar, por preocuparte por las situaciones técnicas que se presentaban como si fueran tuyas, por brindarme de manera incondicional tu apoyo y siempre con una actitud agradable; tu enorme experiencia y consejos fueron claves para el desarrollo de este proyecto, el laboratorio no sería lo mismo sin ti !!!Muchas gracias zetita!!!

Hay mucha gente que ha marcado una etapa en mi vida, con su apoyo, consejo y amistad, “las niñas de la unidad” (**Rocio, Mariana y Jacky**), amigos de la Facultad de Química (**Clarki, Nata, Moni, Angel, Mari, Pol, Ale, Tany, Marco, Adri, Ivan, Paola, Keke, Ara, Ñoscar, Paulina, Klau**), **Familia Rodríguez** (tías, tíos, primos), CII (**Cyn Medina, Marithe, Robert, Dina, Omar, Hayimm, Denis, el grupo de artes**) y mi muy querido y hermoso **Yordi**. Gracias a todos ustedes, ocupan un lugar especial en mi corazón.

INDICE

1. ÍNDICE DE TABLAS.....	7
2. ÍNDICE DE FIGURAS	7
3. ABREVIATURAS.....	9
4. RESUMEN.....	11
5. INTRODUCCIÓN	13
5.1. NEUROBLASTOMA.....	13
5.1.1. Generalidades.....	13
5.1.2. Tratamiento.....	14
5.2. CASIOPEÍNAS.....	14
5.3. APOPTOSIS.....	16
5.3.1. Generalidades.....	16
5.3.2. Vía extrínseca.....	16
5.3.3. Vía intrínseca.....	17
5.4. RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO.....	17
5.4.1. Definición y clasificación.....	17
5.4.2. Estrés oxidante.....	18
5.4.3. Daño por radicales libres.....	19
5.4.4. Defensas antioxidantes.....	20
6. JUSTIFICACIÓN.....	21
7. OBJETIVOS.....	22
8. METODOLOGÍA.....	23
8.1. CULTIVO CELULAR.....	23
8.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50 (CI ₅₀).....	23
8.3. DETERMINACIÓN DE LA MUERTE CELULAR.....	24
8.3.1. Ensayo de lactato deshidrogenasa.....	24

8.3.2. Curva temporal de apoptosis.....	24
8.3.2. Daño a la membrana plasmática.....	25
8.3.3. Moléculas apoptóticas: caspasas-8 y -3, Bcl-2, Bax y citocromo C.....	25
8.3.4. Daño a la membrana mitocondrial.....	26
8.4. IDENTIFICACIÓN DE ROS Y ESTRÉS OXIDANTE.....	27
8.4.1. Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	27
8.4.2. Peróxido (H_2O_2).....	28
8.4.3. Glutación (GSH).....	28
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
10. CONCLUSIONES.....	50
11. BIBLIOGRAFÍA.....	51

1. ÍNDICE DE TABLAS

- TABLA 1. Líneas celulares tratadas con Casiopeínas
- TABLA 2. Principales especies de ROS
- TABLA 3. Antioxidantes enzimáticos
- TABLA 4. Medios de cultivo
- TABLA 5. CI_{50} para cisplatino, Cas IIgly, Cas IIIa y Cas IIIEa

2. ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1. Estructura química de las Casiopeínas
- FIGURA 2. Daño producido por los radicales libres
- FIGURA 3. Reducción del oxígeno molecular mediante la adición sucesiva de electrones
- FIGURA 4. Reacción catalizada por la enzima LDH y la reducción de tetrazolio a formazán acoplado a NADH
- FIGURA 5. Reacciones intracelulares que ocurren con el colorante MitoTracker®
- FIGURA 6. Evaluación del anión superóxido
- FIGURA 7. Formación de resorufina mediante la reacción de AmplexRed® y H_2O_2
- FIGURA 8. Unión del GSH al monoclorobimano, catalizado por la enzima glutatión transferasa
- FIGURA 9. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) para la línea CHP-212.
- FIGURA 10. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) para la línea SK-N-SH.
- FIGURA 11. Comparación de las CI_{50} [μM] para las líneas celulares CHP-212 y SK-N-SH

FIGURA 12. Ensayo de la LDH.

FIGURA 13. Determinación de la citotoxicidad

FIGURA 14. Curva temporal de caspasa-3

FIGURA 15. Determinación de Anexina-V/IP

FIGURA 16. Expresión de proteínas apoptóticas para la línea CHP-212. (A) Western blot para cit C, Bax, caspasa-3 y Bcl-2; (B) Porcentaje de expresión para cada molécula.

FIGURA 17. Expresión de proteínas apoptóticas para la línea SK-N-SH. (A) Western blot para cit C, Bax, caspasa-3 y Bcl-2; (B) Porcentaje de expresión para cada molécula.

FIGURA 18. Disrupción de la membrana mitocondrial en (A) CHP-212 y (B) SK-N-SH.

FIGURA 19. Identificación del radical superóxido por citometría de flujo. A. CHP-212; B. SK-N-SH.

FIGURA 20. Determinación de H₂O₂ por citometría de flujo A. CHP-212 y B. SK-N-SH.

FIGURA 21. Concentración intracelular de glutatión.

3. ABREVIATURAS

2-OGDH	2-Oxoglutarato deshidrogenasa
ANOVA	Análisis de varianza
Apaf-1	Factor activador de la proteasa apoptótica 1
Cas	Casiopeínas
Cas IIgly	Casiopeína IIgly
Cas III Ea	Casiopeína III Ea
Cas III a	Casiopeína III a
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria media
Cit c	Citocromo C
DE	Desviación Estándar
DISC	Complejo señalador de muerte
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucleico
DO	Densidad Óptica
FADD	Dominio de muerte asociado a FAS
FITC	Ficoeritrina
FS	Fosfatidil serina
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
GN	Ganglioneuroma
GNB	Ganglioneuroblastoma
GST	Glutación transferasa
GSSG	Glutación oxidado
HBSS	Solución Salina de Buffer de Hanks
HRP	Peroxidasa de rábano
INT	Sales de tetrazolio



IP	Ioduro de propidio
KRPG	Buffer de Fosfatos Ringer de Krebs
LDH	Lactato deshidrogenasa
MCB	Monoclorobimano
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
NB	Neuroblastoma
PARP	Poli Adenosina Ribosa Fosfato Polimerasa
PBS	Solución de Buffer de Fosfatos
PDH	Piruvato Deshidrogenasa
RL	Radicales Libres
RNA	Acido ribonucleíco
RNAm	Acido ribonucleíco mensajero
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
SDH	Succinato Deshidrogenasa
SNS	Sistema Nervioso Simpático
SOD	Superóxido Dismutasa
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
Trk-A	Receptor de Tirosina Cinasa A
UV	Ultra Violeta
WB	Western blot

4. RESUMEN

El neuroblastoma (NB), es el tumor sólido más frecuente en la infancia, tiene la característica de ser refractario a varios compuestos.

Las Casiopeínas® (Cas) son moléculas de coordinación de Cu II que han mostrado tener un efecto favorable en el tratamiento de diferentes tumores, debido a que el cobre está implicado en la catálisis de las especies reactivas de oxígeno (EROs), las cuales probablemente son la responsables del efecto apoptótico. Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antineoplásica de las Casiopeínas en el NB, e identificar la vía apoptótica mediante la cual ejercen su mecanismo de acción.

Se utilizaron las líneas celulares de neuroblastoma CHP-212 y SK-N-SH tratadas con las Cas IIgly, IIIEa, IIIia y cisplatino como compuesto de comparación. Se estableció la CI_{50} como la concentración de trabajo y con el ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH), se determinó la citotoxicidad de los compuestos. Mediante una curva temporal por Western blot (Wb) para la caspasa-3, se determinó el momento en que las células se morían por apoptosis y para comprobarlo, se analizó la integridad de la membrana plasmática mediante Anexina V/IP, así como la expresión de diferentes proteínas apoptóticas [caspasa-8, bax-2, bax y citocromo C (cit C)] previo fraccionamiento celular, además de la disrupción de la membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) por citometría de flujo. Como indicadores del estrés oxidativo, cuantificamos por citometría de flujo la producción de peróxido de hidrógeno y superóxido, así como la presencia de glutatión (GSH) mediante reacciones colorimétricas.

Las condiciones de trabajo fueron el primer parámetro establecido. Así, encontramos que las CI_{50} para la línea CHP-212 fueron: 68, 21, 14 y 8 $\mu\text{g/ml}$ para cisplatino, Cas IIIia, Cas IIgly y Cas IIIEa respectivamente. En tanto que para la línea SK-N-SH las CI_{50} fueron: 37, 31, 10 y 8 $\mu\text{g/ml}$ para cisplatino, Cas IIIia, Cas IIIEa y Cas IIgly. Mediante una curva temporal, comprobamos la expresión de la caspasa-3 a las 2 h para CHP-212 y a las 4 h para SK-N-SH, que fueron los tiempos de incubación establecidos para las siguientes determinaciones.



La actividad extracelular de la LDH mostró una moderada citotoxicidad para la línea CHP-212 tratada con Cas III_{Ea} (5%) y cisplatino (2%); mientras que la línea SK-N-SH alcanzó una mayor citotoxicidad cuando fue tratada con cisplatino (15%).

Este hecho se confirmó mediante Anexina V/IP, ya que por arriba del 50% de la población tratada con Casiopeínas muere mediante un proceso apoptótico, y solo en las células tratadas con cisplatino, se obtuvieron porcentajes del 15 al 20% de necrosis.

Las moléculas apoptóticas mostraron que la ruta de muerte celular favorecida es la vía apoptótica mitocondrial, ya que con todos los tratamientos y en ambas líneas celulares, se observó la presencia de cit C y caspasa-3, con una disminución de Bax e incremento de Bcl-2, además de la ausencia de caspasa-8. Esto se corroboró observando una disminución en la actividad mitocondrial del 15-20% en ambas líneas celulares.

Considerando el mecanismo mediante el cual se induce la apoptosis, se observó un incremento de EROs posterior a los tratamientos y una consecuente disminución de GSH, como respuesta a un ambiente pro-oxidante.

Por todo lo anterior, concluimos que las Casiopeínas tienen un efecto antineoplásico a concentraciones menores que el cisplatino, mediante un proceso apoptótico activando la vía mitocondrial debido a un ambiente pro-oxidante.

5. INTRODUCCIÓN

5.1 NEUROBLASTOMA

5.1.1 GENERALIDADES

El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracraneal más frecuente en la infancia, deriva de las células de la cresta neural del sistema nervioso simpático (SNS) y presenta un complejo comportamiento [1]. El NB puede observarse a todo lo largo de la cadena del SNS; no obstante, es común que aparezca en la cápsula del riñón y se disemine con rapidez a ganglios linfáticos, hígado, huesos y médula ósea. El NB representa un espectro de tumores que incluyen al neuroblastoma (NB), el ganglioneuroblastoma (GNB) y el ganglioneuroma (GN) [2]. Este tumor presenta una gran heterogeneidad la cual va desde una apariencia celular maligna hasta alcanzar la regresión espontánea, presumiblemente por apoptosis [3].

La etiología del NB aún se desconoce, sin embargo, se han identificado varios factores de riesgo tales como el grado de diferenciación celular, la amplificación del oncogen *N-myc* [4], deleciones en los cromosomas 1p y 11q [5] y ganancia en el cromosoma 17q [6], entre otras regiones del genoma que han sido útiles como herramientas pronósticas en el desarrollo clínico del NB. Los tumores de pronóstico favorable, se caracterizan por tener un cariotipo triploide como resultado de la ganancia de cromosomas. Estos tumores rara vez tienen reordenamientos estructurales, por lo general expresan el receptor de tirosina cinasa A (Trk-A) [7], y habitualmente se presentan en niños menores de 1 año de edad. En tanto que los NB desfavorables tienen un cariotipo diploide y comúnmente están asociados a la amplificación del oncogen *N-myc*, se encuentran en niños mayores de 5 años de edad y tienen múltiples alteraciones cromosómicas.

La heterogeneidad celular y la falta de maduración (por ejemplo, tumores ricos o pobres en estroma y tumores de alto y bajo riesgo, basados en el grado histológico), se relacionan con el comportamiento clínico y son útiles para el pronóstico de la patología. Esta misma heterogeneidad celular se observa en el NB, en donde se han descrito tres fenotipos celulares distintos: neuroblastos simpático-adrenales (tipo-N), células sustrato-adherentes planas y alargadas (tipo-S) y células morfológicamente intermedias (tipo-I) [8]. Cada fenotipo representa un linaje particular dentro de la cresta neural [9].

Al año, uno de cada 100,000 niños en los Estados Unidos desarrolla un NB. Este tumor representa el 7-10% de los cánceres en pacientes pediátricos y constituye el 50% de todas las neoplasias malignas detectadas en los infantes, de acuerdo con el *Reporte de Supervivencia, Epidemiología y Desenlace* (SEER 2007). En México, la frecuencia de NB es de 2.4% de todos los cánceres registrados en la base de datos del Seguro Popular (2009), aunque es posible que esta baja incidencia se deba a la dificultad para diagnosticar los casos con el pronóstico más favorable, algunos de los cuales pudieran haber presentado regresión espontánea [10].

5.1.2. TRATAMIENTO

El tratamiento depende del estadio del tumor y las características de éste, que en la mayoría de los casos incluye cirugía, quimioterapia, radioterapia o una combinación de todas ellas [11]. Los fármacos utilizados para el tratamiento del NB comprenden agentes alquilantes como la ciclofosfamida, melfalan, cisplatino, carboplatino y decarbaxina, así como etopósido y topotecan [12]. En pacientes de alto riesgo, con amplificación del oncogen *N-myc* y/o estadio 4, es común el uso de altas dosis de cisplatino [13]. Sin embargo, el efecto terapéutico de estos fármacos está acompañado de una serie de efectos secundarios que van desde vómitos, pérdida del cabello, hasta daños en órganos vitales como el hígado y los riñones. Por ejemplo, a pesar de la efectividad del cisplatino, su uso está asociado con nefrotoxicidad [14] y ototoxicidad [15], lo cual además de disminuir la calidad de vida del paciente, limita su dosis.

5.2. CASIOPEÍNAS

Las Casiopeínas® (Cas), son una familia de complejos de coordinación cuyo centro metálico es el cobre y en la esfera de coordinación tienen un ligante diimina y un donador N-O (aminoácido), o bien O-O (acetilacetato ó salicilaldehidato) [16]. Se ha demostrado que el empleo de las Cas tiene un efecto favorable en el tratamiento de diferentes neoplasias, con un bajo índice de efectos tóxicos en comparación con los tratamientos convencionales (ver Tabla 1). Este hecho se asocia con una mayor selectividad hacia células tumorales, lo cual se ha observado en fibroblastos gingivales comparados con

células de carcinoma humano epidermoide de lengua (tesis de maestría Chávez-Cortéz 2012 [17]) así como en células progenitoras y troncales de médula ósea de pacientes diagnosticados con leucemia mieloide crónica (sin tratamiento), comparado con pacientes hematológicamente sanos (manuscrito en preparación Sandoval Miguel).

Tabla 1. Líneas celulares tratadas con Casiopeínas.

Casiopeínas	Neoplasia	Línea Celular	Referencia
Cas IIgly, Cas IIIia	Cáncer depulmón	A549 y H157	<i>Kachadourian et al. (2010)</i>
Cas IIgly, Cas IIIia	Meduloblastoma	Daoy	<i>Mejia & Ruiz-Azuara (2008)</i>
Ca IIgly	Cérvix, Ovario	HeLa, SiHa, CaSki, C33-A, CH1	<i>Gracia-Mora et al. (2001)</i>

El cobre es un elemento esencial para los sistemas biológicos, sin embargo, dependiendo de la concentración y naturaleza de sus ligandos, puede resultar tóxico para el organismo. Al igual que el hierro, el cobre cataliza la reacción de Fenton generando una gran cantidad de radical hidroxilo OH^\cdot . La estructura química de estos compuestos se presenta en la Figura 1.

Reacción de Fenton

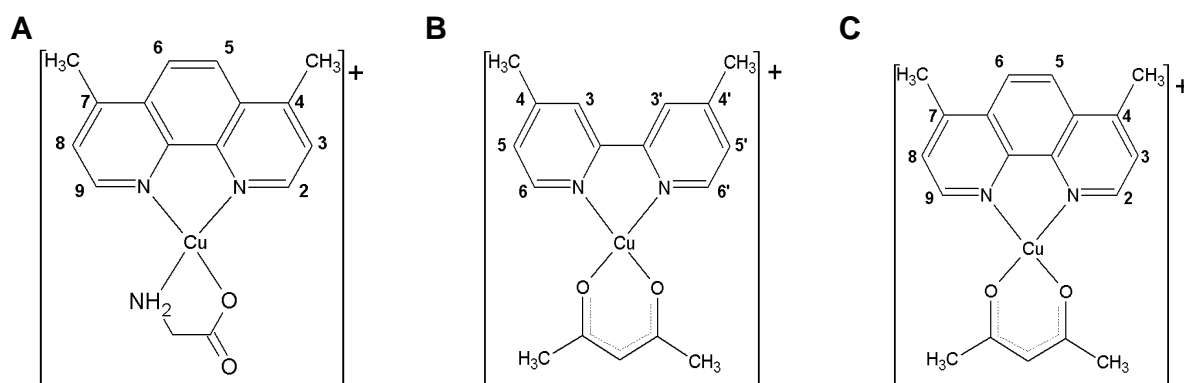


Figura 1. Estructura química de las Casiopeínas. A Cas IIgly, B Cas IIIia y C Cas IIIEa

El mecanismo exacto de la actividad antineoplásica de estos compuestos aún no ha sido dilucidado; sin embargo, se ha relacionado con daño en la mitocondria y un decremento considerable en los niveles intracelulares de glutatión (GSH) [18-21].

5.3 APOPTOSIS

5.3.1. GENERALIDADES

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada y de defensa contra células no deseadas o potencialmente dañinas [22]. Durante el proceso de apoptosis, se observan cambios morfológicos en la célula tales como condensación de la cromatina, cambios estructurales en las membranas y fragmentación de la célula en pequeños cuerpos vesiculares [23]. Estas alteraciones son mediadas por la activación de moléculas que degradan las estructuras celulares, reduciendo al mínimo el daño al tejido que rodea a la célula, para ser removida posteriormente por las células fagocíticas [24].

Los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el inicio y desarrollo de la apoptosis son variados, y dependen del estímulo inicial; por ejemplo, ciertos agentes químicos (cisplatino, doxorubicina, etc) pueden ejercer un efecto tóxico. La apoptosis en respuesta a un estrés celular ocasionado por la exposición a dosis tóxicas de un compuesto, puede seguir dos vías principalmente: una vía extrínseca mediada por receptores de muerte y otra intrínseca o también llamada mitocondrial [25, 26].

5.3.2. VÍA EXTRÍNSECA

Esta vía, se inicia por la estimulación de los receptores de muerte transmembranales como el receptor Fas y el receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1). Esta activación se da por la unión del receptor de muerte a su ligando Fas (FasL) y el factor de necrosis tumoral (TNF), respectivamente. Posterior a esta activación, la molécula adaptadora asociada al dominio de muerte de Fas (FADD) y la procaspasa-8, son reclutadas para formar un complejo señalador de muerte (DISC) [27, 28]. La procaspasa-8 pasa a caspasa-8 por este complejo que es capaz de activar directamente a la caspasa efectora -3, para iniciar así la degradación celular [27, 29, 30].

5.3.3. VÍA INTRÍNSECA

Esta vía se activa por estrés celular, específicamente por estrés mitocondrial causado por factores tales como daño nuclear o por agentes químicos. En esta ruta, se lleva a cabo la oligomerización y traslación del heterodímero Bak/Bax desde el citoplasma hacia la membrana mitocondrial externa, resultando en la formación de un poro mitocondrial. Este proceso desencadena una serie de eventos que paulatinamente llevarán a la muerte celular. Así por ejemplo, se ocasiona la despolarización de la membrana mitocondrial interna [31], permitiendo que se libere el cit C al citosol [22], que al unirse a Apaf-1 (factor activador de la proteasa apoptótica) y a la caspasa-9, forman el apoptosoma (*heptámero de caspasa-9/Apaf-1/cit C*) [30, 31]. Una vez formado el apoptosoma, en el citosol se activan las caspasas-3, -6 y -7, las cuales son moléculas efectoras de la apoptosis. Se ha observado que el aumento de especies reactivas de oxígeno (EROs), es capaz de alterar el estado basal de la mitocondria, sometiéndola a estrés oxidativo, un evento que desencadena la vía intrínseca de la apoptosis [33]

5.4. RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

5.4.1 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN

Los radicales libres (RL) son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón no apareado, pueden existir de forma independiente y debido a la inestabilidad de su configuración electrónica, son generalmente muy reactivos. Esta reactividad es la base de su toxicidad y de su vida media [34]. En los sistemas vivos se generan muchos tipos de radicales libres, siendo las más conocidas las EROs, que incluyen a las especies radicales y a las no radicales.

En la Tabla 2, se muestran las principales moléculas implicadas en la biología REDOX [35].

TABLA 2. Principales especies reactivas de oxígeno

EROs			
Radicales		No Radicales	
Anión superóxido	($O_2^{\cdot-}$)	Peróxido de hidrógeno	(H_2O_2)
Hidroxilo	(OH^{\cdot})	Ozono	(O_3)
Peroxilo	(ROO^{\cdot})	Oxígeno singulete	($^1 \Delta O_2$)
Alcóxido	(RO^{\cdot})	Acido hipocloroso	HClO

Las EROs son necesarias para mantener la homeostasis celular. Estas especies normalmente existen en todas las células aeróbicas, en un balance con los antioxidantes bioquímicos exógenos y endógenos.

5.4.2. ESTRÉS OXIDANTE

El estrés oxidante ocurre cuando el equilibrio entre pro-oxidantes (EROs) y antioxidantes es interrumpido con un aumento de RL, una disminución de antioxidantes, o ambas. Dado que el estado redox del organismo es prácticamente estable, el estrés oxidante es un fenómeno que se presenta solo en compartimentos corporales [36]. De manera general, son tres las principales alteraciones intracelulares que de forma directa ocasionan el estrés oxidante:

1. La sobreproducción de especies oxidantes como el peróxido (H_2O_2) y de radicales libres como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$).
2. La liberación de los complejos iónicos presentes en algunas macromoléculas de importancia biológica.
3. La modificación de las defensas contra los radicales libres.

Para que todas o algunas de estas modificaciones se presenten en la célula, es necesario que se den ciertas condiciones, ya sea ocasionadas por factores exógenos o endógenos [37]. Dentro de las exógenas se encuentran diferentes alimentos, contaminantes, fármacos, radiaciones. etc. Por lo que respecta a las endógenas, abarcan una serie de alteraciones patológicas o fisiológicas, algunas de las cuales están determinadas por el estilo de vida.

5.4.3. DAÑO PRODUCIDO POR LOS RADICALES LIBRES

Cuando en un organismo existe un exceso de RL, prácticamente cualquier estructura biológica que lo integra (DNA, RNA, proteínas, lípidos, carbohidratos), puede convertirse en diana de la acción de éstas especies reactivas y resultar dañada. El daño causado por el ataque de las EROs puede originar lesiones en el DNA, pérdida de función de enzimas, incremento de la permeabilidad celular, disrupción de la señalización de la célula e incluso muerte celular por necrosis o apoptosis (Figura 2) [38].

Cabe destacar que no todas las EROs presentan la misma capacidad de reacción. Ciertos compuestos como H_2O_2 , NO , $O_2\cdot-$ reaccionan de forma relativamente selectiva con solo ciertas moléculas biológicas; mientras que el radical $OH\cdot$ es altamente reactivo, reaccionando instantáneamente con cualquier molécula.

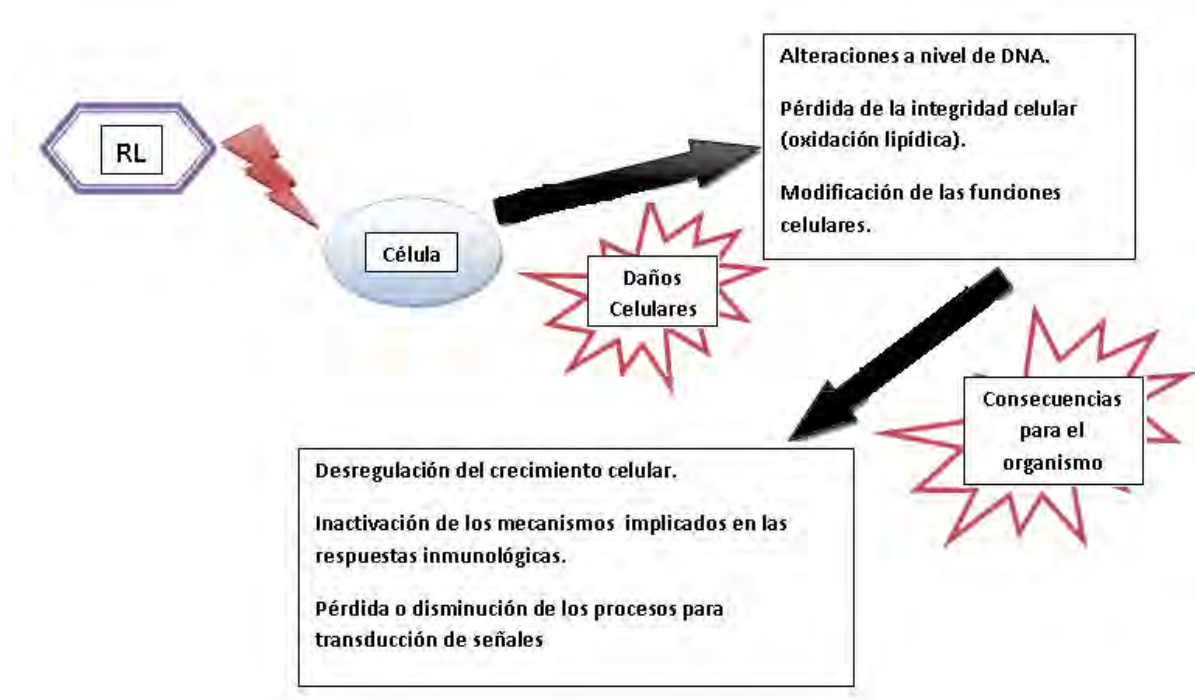


FIGURA 2. Daño producido por los radicales libres

5.4.4. DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Las defensas antioxidantes son aquellas sustancias que presentes en bajas concentraciones en comparación con un sustrato oxidable, retrasan, previenen o impiden significativamente la oxidación del sustrato [39]. Las defensas antioxidantes endógenas, son principalmente de carácter enzimático (Tabla 3).

TABLA 3. Antioxidantes enzimáticos

DEFENSAS ANTIOXIDANTES	
<i>Endógenos enzimáticos</i>	<i>Ubicación</i>
Superóxido dismutasa (SOD)	Citosol y mitocondrias
Glutación peroxidasa	Citosol y mitocondrias
Catalasa	Peroxisomas

El 5% del oxígeno molecular se convierte en EROs en la mitocondria, donde la enzima superóxido dismutasa (SOD) es la encargada de transformar el $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 y O_2 . El $(O_2^{\bullet-})$, (H_2O_2) y el $(OH\cdot)$, se forman como intermediarios en el proceso de reducción de una molécula de oxígeno a agua (Figura 3).

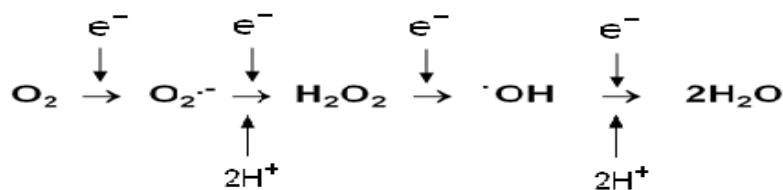


FIGURA 3. Reducción del oxígeno molecular mediante la adición sucesiva de electrones

6. JUSTIFICACIÓN

Los análisis genéticos y biológicos del neuroblastoma proporcionan información importante para guiar a una terapia óptima, que sea más efectiva y menos tóxica para el paciente. Debido a que el empleo de las Casiopeínas® tiene un efecto favorable en el tratamiento de tumores, con un bajo índice de efectos tóxicos en comparación con los tratamientos convencionales, es preciso comprender el mecanismo molecular mediante el cual actúan para ejercer su efecto biológico; por lo que nuestro **objetivo general** fue identificar en el neuroblastoma la vía apoptótica mediante la cual las Casiopeínas ejercen su mecanismo de acción y el papel de las especies reactivas de oxígeno en este proceso.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer la concentración inhibitoria media de cisplatino, Cas IIgly, Cas IIIa y Cas IIIEa, en dos líneas celulares de neuroblastoma.
2. Determinar la vía apoptótica favorecida por efecto de las Casiopeínas en el neuroblastoma.
3. Identificar la presencia de especies reactivas de oxígeno como resultado del tratamiento con Casiopeínas
4. Analizar el comportamiento de compuestos antioxidantes con la administración de Casiopeínas.

8. METODOLOGÍA

8.1. CULTIVOS CELULARES

Se emplearon las líneas celulares de neuroblastoma CHP-212 y SK-N-SH. Las células se sembraron en los medios de cultivo descritos en la Tabla 4 y se mantuvieron a 37°C en incubadora con 5% CO₂ bajo condiciones estériles.

TABLA 4. Medios de cultivos

Línea Celular	
<u>CHP-212</u>	<u>SK-N-SH</u>
DMEM-F12	DMEM
SFB 10%	SFB10%
antibiótico-antimicótico 1%	antibiótico-antimicótico 1%
aminoácidos no esenciales 1%	

8.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50 (CI₅₀)

La determinación de la CI₅₀ se realizó mediante cuantificación con cámara de Neubauer. Se sembraron 8x10⁴ células en 100 µl de medio por pozo, en placas de 24 pozos, incubándose a 37°C y 5% de CO₂ por 24 h, para que se recuperaran de la tripsinización. Al término de este tiempo, se retiró el medio y se agregaron 90% de medio más 10% de cisplatino, Cas IIgly, Cas IIIa o Cas IIIEa en concentraciones crecientes de 0.1, 1, 10 y 100 µg/ml (usando como vehículo agua bidestilada), durante 24 h. Al finalizar este tiempo, las células se contaron mediante cámara de Neubauer, utilizando azul tripano como indicador de viabilidad celular. De los resultados obtenidos se abrió un nuevo intervalo de concentraciones, hasta obtener la CI₅₀.

8.3 DETERMINACIÓN DE LA MUERTE CELULAR

8.3.1. ENSAYO DE LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

La presencia de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante de cultivo, es proporcional al número de células lisadas y por tanto necróticas. Se trata de un método colorimétrico que permite la medición de la actividad de LDH utilizando una mezcla de L-lactato, nicotina adenina dinucleótido oxidada (NAD⁺) y sales de tetrazolio (INT). La enzima LDH cataliza la reducción de la NAD⁺ a NADH (nicotina adenina dinucleótido reducida) en presencia de L-lactato; mientras que la formación de NADH se puede medir mediante una reacción acoplada en la que la INT, se reduce hasta un producto de formazán rojo (Figura 4).

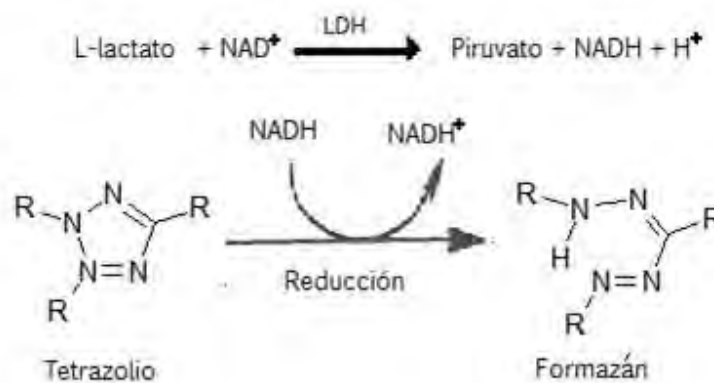


Figura 4. Reacción catalizada por la enzima LDH, y la reducción de tetrazolio a formazán acoplado a NADH.

Se empleó el kit LDH-Cytotoxicity Assay (BioVision), en una densidad de 2×10^4 células por pozo, las cuales se incubaron con los respectivos tratamientos durante 24 h, momento en el cual se retiró el medio de cultivo. Se utilizó un control positivo (1% de Tritón X-100) y un control negativo (sin tratamiento). La cantidad e intensidad del formazán solubilizado se midió espectrofotométricamente a 500 nm.

8.3.2. IDENTIFICACIÓN DE MOLÉCULAS APOPTÓTICAS

La determinación de las moléculas involucradas en la apoptosis se hizo a las 24 horas mediante Western blot (Wb) para la caspasa-3 activa. Previamente, se realizó fraccionamiento celular con el kit de fraccionamiento citosol/mitocondria (Calbiochem, CA), empleando la fracción citoplásmica para la extracción de proteínas. Las muestras conteniendo 6-10 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas, se colocaron en un buffer de carga con 5% de β -mercaptoetanol, se hirvieron durante 5 min y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12%, con la finalidad de separar las proteínas desnaturalizadas. Posteriormente, éstas se transfirieron desde el gel hacia una membrana de nitrocelulosa (BioRad, CA), seguido por la hibridación con el anticuerpo primario, el cual fue reconocido con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (Santa Cruz, CA). La señal se detectó por quimioluminiscencia con el kit SuperSignal West® (Thermo Scientific) y la intensidad de las bandas se cuantificó con el software ImageJ, versión 1.41 ®.

Debido a que la caspasa-3 activa no se expresó a las 24 h, decidimos realizar una curva temporal, en donde observamos la presencia de esta proteína a las 2 h posteriores al tratamiento para las células CHP-212 y 4 h para SK-N-SH, estos son los tiempos que se establecieron para llevar a cabo las siguientes determinaciones.

Siguiendo la misma metodología del Wb, se analizaron la caspasa-8 y las moléculas cit C, Bcl-2 y Bax, utilizando β -tubulina como control de carga (todos los anticuerpos fueron de Santa Cruz, Ca).

8.3.3. DAÑO A LA MEMBRANA PLASMÁTICA

La membrana plasmática está constituida por una bicapa lipídica que entre sus componentes, contiene fosfatidilserina (FS) la cual en condiciones normales, se localiza en la monocapa interna de la membrana celular. Cuando una célula entra en apoptosis, dicha membrana cambia su estructura de bicapa a monocapa, exponiendo la FS al espacio extracelular. La Anexina V, es una proteína que se une específicamente a la FS expuesta en el espacio extracelular. Por otro lado, el yoduro de propidio (IP) difunde en aquellas células que tienen alterada la integridad de la membrana plasmática, uniéndose al DNA como resultado de un proceso de necrosis. Esta determinación se realizó por

citometría de flujo, logrando diferenciar al mismo tiempo, células sanas, necróticas y apoptóticas.

A las células (1×10^6) se les administró la CI_{50} correspondiente y posterior al periodo de incubación establecido, fueron tratadas con 5 μ l de Anexina-V (Annexin-V-FITC Apoptosis Detection kit de Sigma) y 10 μ l de IP (solución stock 50 μ g/ml) por 10 min, en ausencia de luz y a temperatura ambiente. Se empleó estaurosporina (50 μ g/ml) (ENZO Life Sciences) por 18 hrs, como control de apoptosis y Tween 20 al 15% como control necrótico. La fluorescencia se detectó en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson Biosciences), cuantificando 10,000 eventos por muestra, usando el canal FL1 para medir Anexina-V y FL2 para IP. Se utilizó el programa FlowJo para realizar el análisis estadístico.

8.3.5 DAÑO A LA MEMBRANA MITOCONDRIAL

El daño a la membrana mitocondrial se identificó mediante MitoTracker™, cuyo principio se basa en la utilización de un colorante fluorescente, selectivo y permeable a membrana. Este colorante difunde pasivamente y se acumula en las mitocondrias con respiración activa. Cuenta con un fragmento cloro-metilo que parece ser el responsable de mantener el colorante asociado a las mitocondrias y una vez incorporado emite fluorescencia (Figura 5).

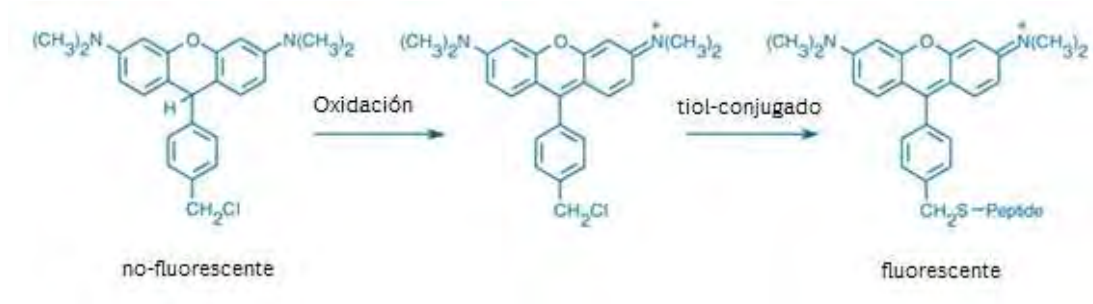


Figura 5. Reacciones intracelulares que ocurren con el colorante MitoTracker™

Un total de 1×10^6 células se incubaron con 50 nM de MitoTracker™ Green CmxRos (Molecular 7 Probes), durante 20 min a 37°C. Se realizaron 2 lavados con PBS y se analizó la fluorescencia con el citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Biosciences), utilizando el canal FL1-H en la detección y el programa FlowJo para analizar los datos.

8.4 IDENTIFICACIÓN DE ROS Y ESTRÉS OXIDANTE

8.4.1. SUPERÓXIDO ($O_2^{\bullet-}$)

En la identificación de $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial, se empleó un colorante indicador fluorescente altamente selectivo para superóxido (MitoSox™). Una vez dentro de la mitocondria, este reactivo es oxidado específicamente por el anión $O_2^{\bullet-}$, emitiendo una fluorescencia de color rojo detectable por citometría de flujo (Figura 6).

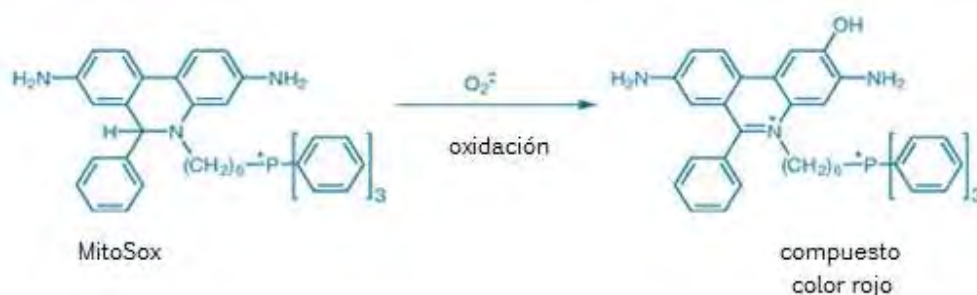


Figura 6. Evaluación del anión superóxido.

Se incubaron 1×10^6 células en 250 μ l de MitoSox™ diluido en DMSO (solución stock 5 mM), durante 10 min en oscuridad a 37°C. Transcurrido ese tiempo, las células se lavaron con el buffer HBSS. Como control positivo se utilizaron células sometidas a radiación UV durante 3 h y la fluorescencia se analizó en el canal FL2-H en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson Biosciences). Se utilizó el programa FlowJo para analizar estadísticamente los datos.

8.4.2. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H₂O₂)

Para la identificación de peróxido de hidrógeno se empleó AmplexRed™, un sustrato incoloro que reacciona estequiométricamente con el H₂O₂ en una relación 1:1. El producto que se genera de esta reacción es resorufina, la cual se detecta por citometría de flujo (Figura 7).



Figura 7. Formación de resorufina mediante la reacción de AmplexRed y H₂O₂

Las células (1.5×10^4) se lavaron con el buffer KRPG (Buffer de fosfatos Ringer de Krebs), y se incubaron con la mezcla de reacción (50 μ M de AmplexRed™ + 0.1 U/ml de HRP) durante 30 min en ausencia de luz. Se utilizaron como control positivo células UV radiadas durante 3 h. La fluorescencia se analizó por citometría de flujo con el FACScan (Becton Dickinson Biosciences), empleando para la detección el canal FL2-H. Se utilizó el programa FlowJo para el análisis estadístico de los datos.

8.4.3. GLUTATIÓN (GSH)

El glutatión es un tiol de bajo peso molecular que juega un papel crítico en la defensa celular contra el estrés oxidante y nitrante en mamíferos. Se han observado bajos niveles de glutatión en etapas tempranas de la apoptosis. Los cambios en el GSH se detectaron con el kit Glutathione (Calbiochem, CA) mediante monoclorobimano (MCB), un colorante que forma una unión exclusivamente con el GSH. El MCB sin unir, no fluoresce, mientras que una vez unido al glutatión forma un tinte azul fluorescente (380 nm/461 nm, excitación

y emisión respectivamente). La reacción es catalizada por la Glutación-S-Transferasa (GST) (Figura 8), de tal modo que los cambios en los niveles de glutatión durante la apoptosis, se pueden detectar fácilmente usando un fluorómetro o un lector de placa de 96 pozos.

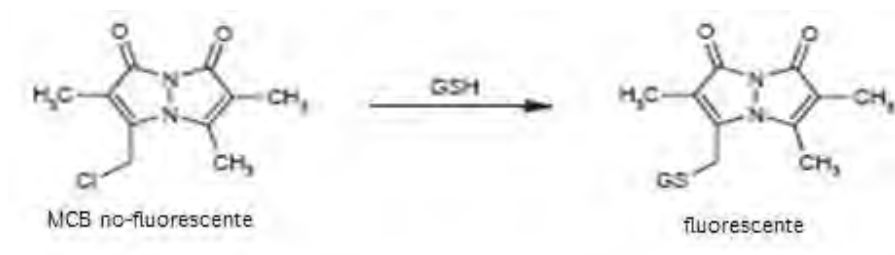


Figura 8. Unión del GSH al monochlorobimano, catalizado por la GST.

Un millón de células fueron lavadas con PBS y se resuspendieron en buffer de lisis durante 10 min en hielo; posteriormente se agregaron 25 μ M of MCB + 50 U/ml de la enzima GST, durante 30 min a 37°C. Los cambios en la fluorescencia se detectaron mediante un lector de placa a 380/460 nm.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las metodologías planteadas se realizaron por duplicado, en tres experimentos independientes, los datos se presentan como la media \pm desviación estándar (D.E.). Los datos se analizaron para diferencias significativas usando ANOVA con una significancia estadística de $p < 0.05$.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀)

Se determinó la CI₅₀ para el cisplatino y las Casiopeínas en cada línea celular, mediante un método de conteo con cámara de Neubauer. La CI₅₀ se estableció como la concentración de trabajo para los posteriores experimentos.

En el caso de la línea CHP-212, las CI₅₀ fueron: 68 µg/ml para el cisplatino, 14, 21 y 8 µg/ml para las Casiopeínas IIgly, IIIa y IIIEa, respectivamente (Tabla 5 y Figura 9).

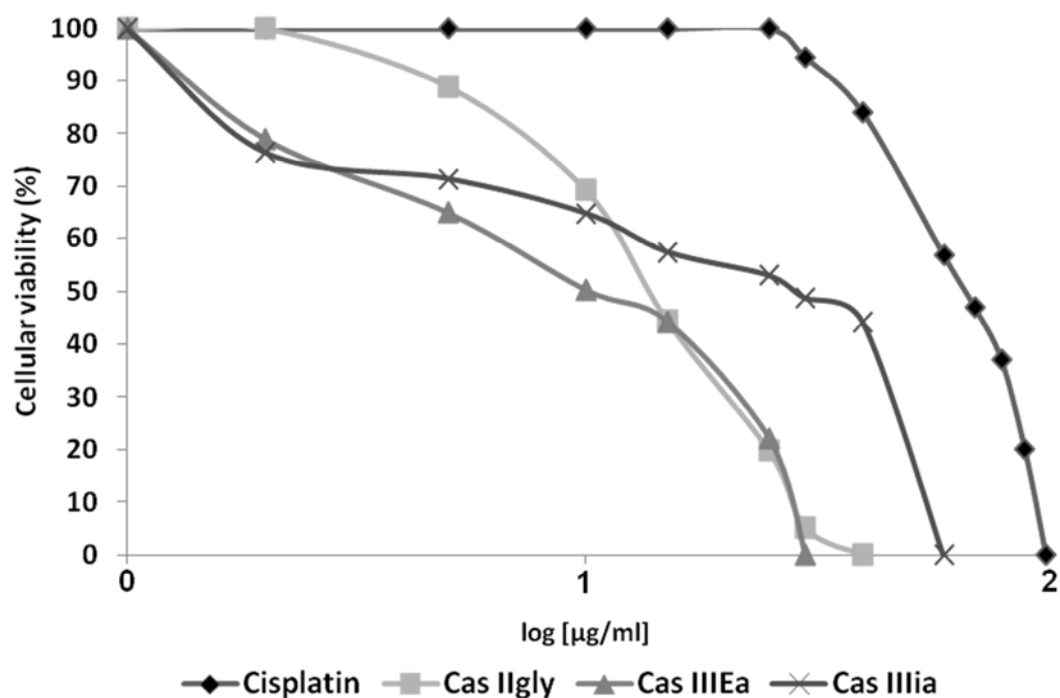


Figura 9. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) en la línea celular CHP-212. Se realizó mediante el uso de la cámara de Neubauer, utilizando azul tripano como indicador de viabilidad, para los tratamientos: cisplatino, Cas IIgly, Cas IIIa y Cas IIIEa. Las gráficas representan el promedio de tres experimentos independientes.

Las concentraciones de trabajo para la línea celular SK-N-SH después de 24 h con los diferentes tratamientos, fueron: 37 $\mu\text{g/ml}$ para el cisplatino, 8, 31 y 10 $\mu\text{g/ml}$ para las Casiopeínas IIgly, IIIia y IIIEa, respectivamente (Tabla 5 y Figura 10).

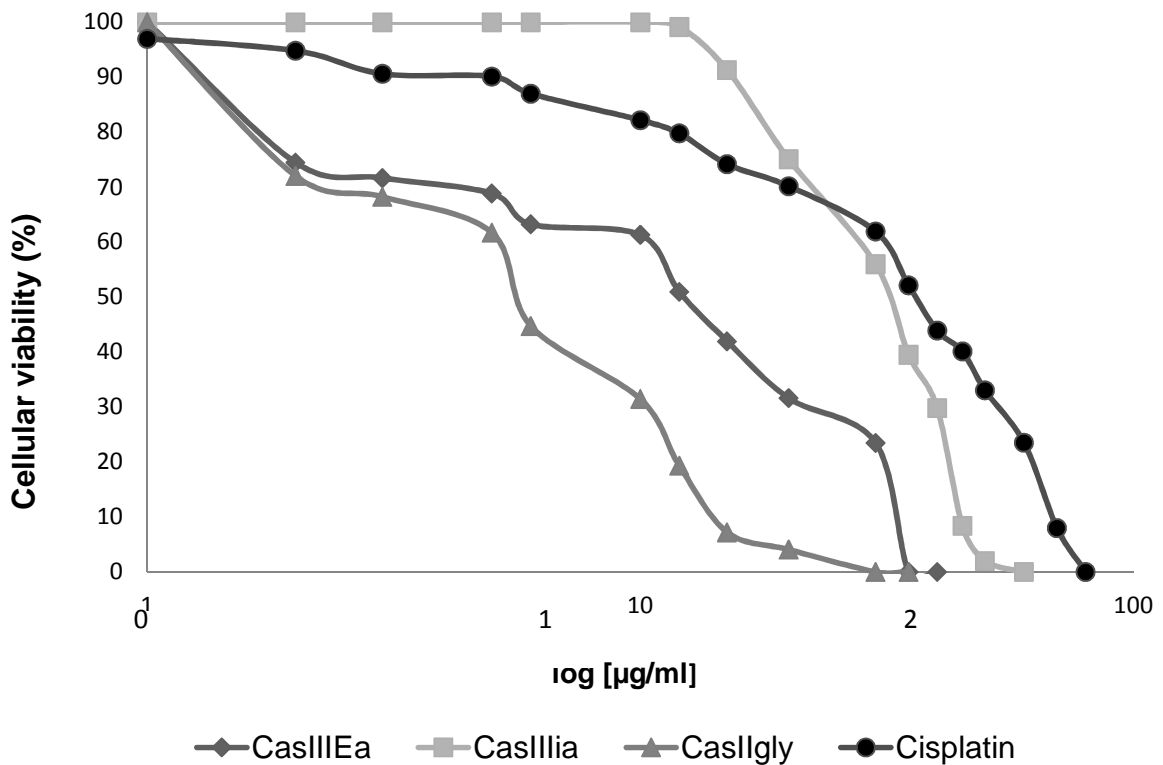


Figura 10. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) en la línea SK-N-SH. Mediante el uso de la cámara de Neubauer, utilizando azul tripano como indicador de viabilidad, para los tratamientos: cisplatino, Cas IIgly, Cas IIIia y Cas IIIEa. Las gráficas representan el promedio de tres experimentos independientes.

Estos resultados sugieren que las Casiopeínas IIgly, IIIia y IIIEa tienen un efecto antineoplásico en el neuroblastoma debido a que inhiben la proliferación celular [41]

Tabla 5. CI_{50} para cisplatino, Cas IIgly, Cas IIIia y Cas IIIEa en células de neuroblastoma.

línea celular	CHP-212		SK-N-SH	
	CI_{50} $\mu\text{g/ml}$	CI_{50} μM	CI_{50} $\mu\text{g/ml}$	CI_{50} μM
Cisplatino	68±1.03	226.7±1.03	37±1.08	123.3±1.08
Cas IIgly	14±2.34	31.5±2.34	8±1.97	18.0±1.97
Cas IIIia	21±1.70	47.2±1.70	31±2.34	69.7±2.34
Cas IIIEa	8±2.09	18.6±2.09	10±1.70	22.2±1.70

Comparación de CI_{50}

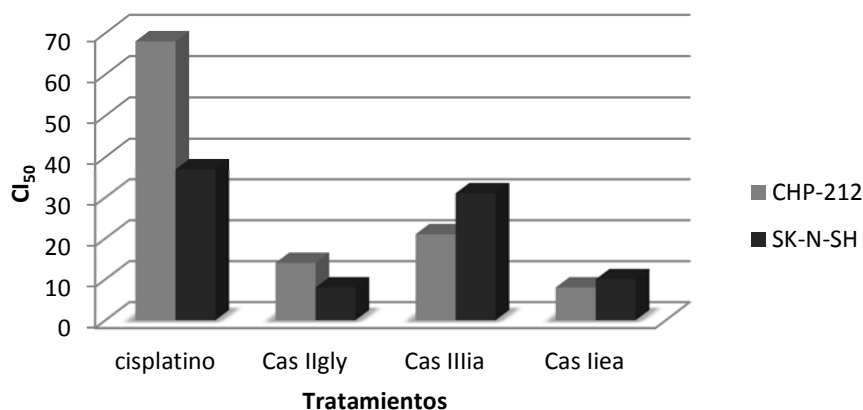


Figura 11. Comparación de las CI_{50} [μM] para las líneas celulares CHP-212 y SK-N-SH

La CI_{50} además de representar la concentración a la cual existe un 50% de inhibición en la propagación celular, también es un parámetro de eficacia y potencia de un compuesto. En base a esto, y como se observa en la Tabla 5 y en la figura 14, en ambas líneas celulares las Casiopeínas presentaron una CI_{50}

menor que la del cisplatino, por lo que se puede deducir que son más eficientes que el cisplatino al inhibir la proliferación celular.

De manera particular en el caso de la línea CHP-212, el compuesto que mostró más eficiencia fue la Cas III_{Ea} seguida de la Cas II_{gly}, la Cas III_{ia} y el cisplatino respectivamente (Cas III_{Ea} > Cas II_{gly} > Cas III_{ia} > cisplatino). Mientras que para la línea SK-N-SH el compuesto que mostró mayor eficiencia fue la Cas II_{gly} seguida de la Cas III_{Ea}, Cas III_{ia} y cisplatino respectivamente (Cas II_{gly} > Cas III_{Ea} > Cas III_{ia} > cisplatino). La actividad antiproliferativa de las Cas II_{gly} y III_{ia} se ha reportado en el meduloblastoma donde de igual manera, se obtienen CI₅₀ menores que el cisplatino [18].

Ensayo de la Lactato Deshidrogenasa

Se determinó la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante del medio de cultivo mediante una reacción enzimática, donde la LDH oxida el L-lactato y mediante una reacción acoplada se obtiene formazán. La cantidad de formazán es directamente proporcional al número de células lisadas mediante necrosis, debido a que el proceso de muerte celular programada forma cuerpos apoptóticos, lo cual impide que salga el contenido celular al medio extracelular.

La máxima cantidad de muerte por necrosis (100%), se midió a las 24 h post-tratamiento y se identificó como el daño alcanzado al añadir al medio 1% de Tritón, lo que conformó nuestro control positivo. En contraparte, el control negativo (0%) se refiere al medio obtenido de cultivos celulares sin tratamiento. Para la línea celular CHP-212, la actividad de la LDH fue muy similar al control negativo, y solo se observó un ligero aumento en el medio de las células tratadas con Cas III_{Ea} (Figura 12).

El porcentaje de citotoxicidad representa la cantidad porcentual de células que sufrieron una alteración en la integridad de la membrana plasmática, lo que posteriormente originó lisis celular mediante un proceso necrótico. Para la línea celular CHP-212 la Cas III_{Ea} presentó un 5% de citotoxicidad; mientras que el cisplatino produjo 2%; por su parte las Casiopeínas II_{gly} y III_{ia}, no presentaron citotoxicidad (Figura 13).

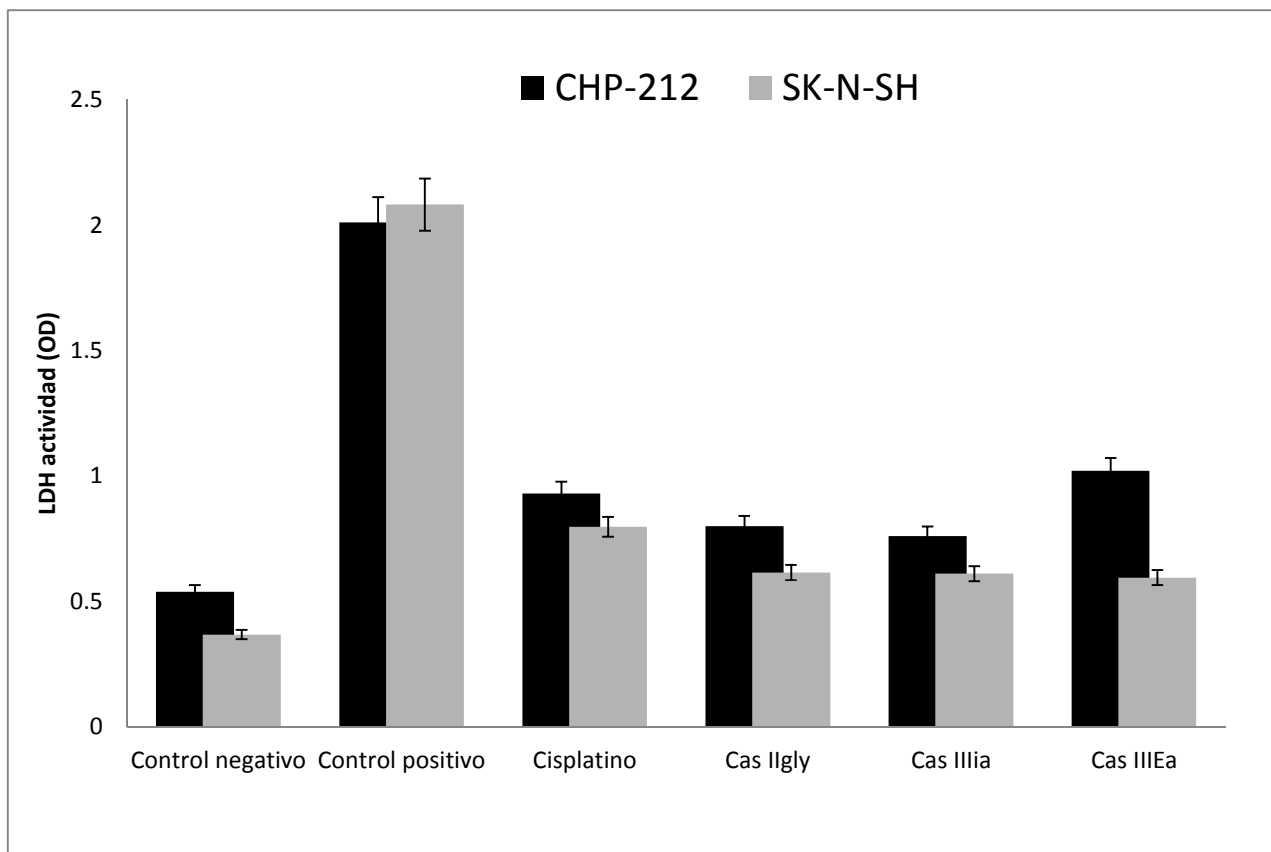


Figura 12. Ensayo de la actividad de LDH. La determinación de esta enzima se realizó 24 h después de la administración de las correspondientes Cl_{50} ; control negativo (sin tratamiento) y control positivo (1% de Tritón X-100). Las gráficas representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes.

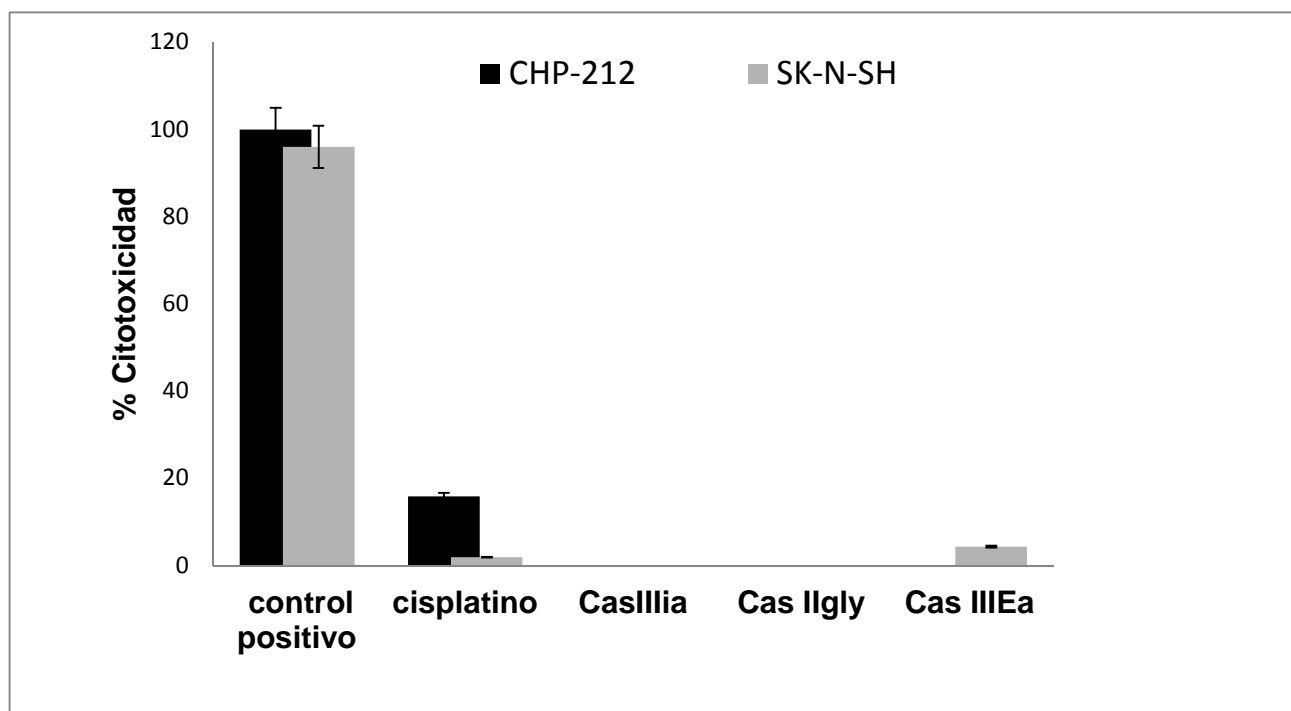


Figura 13. Determinación de citotoxicidad. En las líneas celulares CHP-212 y SK-N-SH, se determinó el daño celular 24 h posterior a la administración de la correspondiente CI_{50} de cisplatino, Cas IIIa, Cas IIgly, Cas IIIEa, así como el control positivo (1% de Tritón X-100). Las gráficas representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes.

En el caso de la línea celular SK-N-SH, la actividad de la LDH es mayor con el tratamiento de cisplatino, mientras que con las Casiopeínas se observa una actividad similar a la del Control negativo (Figura 12). Así mismo, la citotoxicidad para esta línea celular también fue alta con el tratamiento con cisplatino (15%), mientras que las Casiopeínas no indujeron necrosis (Figura 13). Con estos resultados, concluimos que la muerte celular observada en la línea SK-N-SH no está dada por necrosis y que a las concentraciones que se administraron los diferentes tratamientos (CI_{50}), las Casiopeínas presentan una menor o incluso nula citotoxicidad comparada con el cisplatino. Por otra parte, aunque en la línea celular CHP-212 la Cas IIIEa mostró un ligero grado de citotoxicidad, esta Casiopeína es la que presenta una menor CI_{50} , con lo cual podemos deducir que un ligero porcentaje de su actividad inhibiendo la proliferación celular, está dado por necrosis.

Curva Temporal de Apoptosis

Como un primer paso para comprobar la presencia de apoptosis, evaluamos la expresión de la caspasa efectora -3, a las 24 h posteriores a los tratamientos. Debido a que no logramos detectarla a este tiempo, decidimos realizar una curva temporal a las 0.5, 1, 4 y 6 h. Para la línea CHP-212 se encontró la caspasa-3 a las 2 h, mientras que para las células SK-N-SH fue hasta las 4 h (Figura 14). Todas las determinaciones posteriores se realizaron a estos tiempos de incubación.

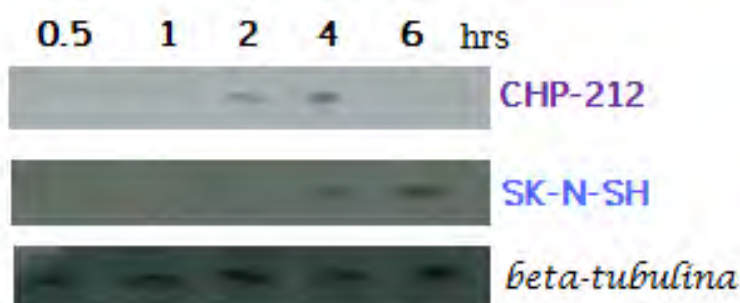


Figura 14. Curva temporal de caspasa-3 activa. Western blot para las líneas celulares SK-N-SH y CHP-212, utilizando como control de carga β -tubulina. Resultados obtenidos de tres experimentos independientes con los tratamientos cisplatino, Cas IIgly, Cas IIIia y Cas IIIEa.

Daño a la Membrana Plasmática

La identificación del daño a la membrana plasmática se realizó mediante Anexina-V e IP. La Anexina-V se une de manera selectiva a la FS, un lípido que se expone en la superficie de la membrana plasmática cuando se desencadena el proceso apoptótico; mientras que el IP que es un compuesto impermeable a la membrana plasmática, solo difunde en aquellas células en donde la integridad se ve alterada como consecuencia del daño por necrosis. Este proceso se cuantificó mediante citometría de flujo. En la figura 15, el cuadrante inferior derecho corresponde a las células apoptóticas (Anexina-V); en el cuadrante superior izquierdo se encuentran las células necróticas (IP) y en el cuadrante superior derecho las células que sufrieron necrosis secundaria (doble marcaje con Anexina-V-IP), es decir, una muerte celular que inicia como apoptosis y al generarse un daño mayor, se desencadena un proceso necrótico; el cuadrante restante es el control sin tratamiento.

En la línea CHP-212 (Figura 15 A), se observó más del 50% de apoptosis en todos los tratamientos, con un pico para la Cas IIIEa (60%). El porcentaje de células necróticas en todos los casos se encontró en un intervalo de 1.4-2.2%; mientras que la necrosis secundaria fue de 18-20% para todos los tratamientos. Para la línea SK-N-SH (Figura 15 B), la apoptosis fue mayor del 40% para todos los tratamientos, con la mayor expresión para la Cas IIIia (56.6%). La necrosis se mantuvo por debajo del 1%, en tanto que la necrosis secundaria se vio incrementada con los tratamientos de cisplatino (44%), Cas IIIia (28%) y Cas IIIEa (39%).

Lo anterior nos indica que el proceso mediante el cual las Casiopeínas inhiben la proliferación celular en el NB es preferentemente apoptótico. Sin embargo, en el caso de la línea SK-N-SH hay una participación importante de necrosis secundaria, principalmente con el tratamiento con cisplatino, lo cual puede estar relacionado con los efectos tóxicos de este compuesto, para el cual ya se han reportado acumulación en hígado y riñones causando nefrotoxicidad y ototoxicidad [15]. Las Cas IIIia y Cas IIIEa también mostraron un incremento en el porcentaje de células con necrosis secundaria, sin embargo están por debajo del cisplatino, lo cual nos permite intuir que su toxicidad es menor.

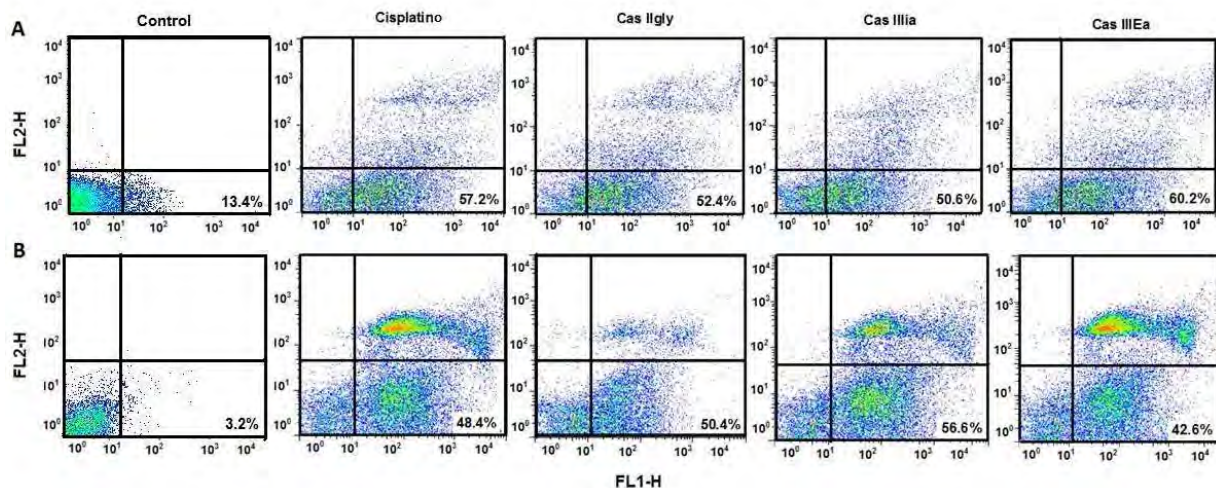


Figura 15. Determinación de Anexina-V/IP. A. La determinación se realizó 2 h posteriores al tratamiento para CHP-212 (A) y 4 h para SK-N-SH (B); se administró la CI_{50} correspondiente y se cuantificaron 10,000 eventos por tratamiento. Los porcentajes corresponden al promedio de las células apoptóticas en tres experimentos independientes. El cuadrante superior izquierdo corresponde a las células necróticas, el cuadrante inferior derecho a las células apoptóticas, y el cuadrante superior derecho a las células con doble marcador

Identificación de Moléculas Apoptóticas

Se buscó la expresión proteica de las caspasas-3 y -8, cit C, Bcl-2 y Bax en la fracción citósolica mediante Wb, utilizando β -tubulina como control de carga. En ambas líneas celulares, se observó la presencia de caspasa-3 en las células que fueron sometidas a tratamiento, con un porcentaje de densidad óptica (% DO) cercano al 20%. La caspasa-3 se considera una caspasa efectora ya que es capaz de activar compuestos como lamina, PARP, ICAD y fodrina, los que posteriormente escinden una variedad de sustratos responsables de evidenciar las características morfológicas de la apoptosis, tales como la fragmentación del DNA y la exposición de la FS en la superficie celular (marcador para la fagocitosis) [45]. Es por esto que la presencia de caspasa-3 es indicativa de que las Casiopeínas y el cisplatino inducen apoptosis (Figuras 16; 17 A y B).

Por otra parte, el cit C es una molécula que se encuentra dentro de la mitocondria y participa en la transferencia de electrones en la cadena respiratoria celular y su presencia en el citoplasma, es indicativa de apoptosis mediante la vía intrínseca [46]. En ambas líneas celulares, se observó la expresión del cit C en un 20-30% (DO); sin embargo, en las células control se observó un 7 y 6% (DO) en CHP-212 y SK-N-SH respectivamente, lo cual puede deberse a una apoptosis basal. Como consecuencia de la liberación del cit C, se pierde la capacidad del transporte de electrones en la cadena respiratoria, esta inactivación causa la permeabilización de la membrana mitocondrial, lo que provoca la pérdida del potencial de membrana. Por todo esto, la liberación de cit C es la señal principal que envía la mitocondria para amplificar y desencadenar el proceso de muerte, lo que se considera un componente esencial para la activación de la caspasa-3 [45].

Bax es una proteína proapoptótica que se encuentra en el citoplasma, su función es translocarse a la membrana mitocondrial interna alterando su integridad mediante la formación de un poro o canal, el cual que permite la liberación de moléculas como el cit C [47]. En ambas líneas celulares, se observó una disminución en la presencia ésta proteína de hasta el 15% en el citosol de las células tratadas con respecto a las células control, lo cual puede ser indicativo de la entrada de Bax a la mitocondria como resultado de la activación de la apoptosis intrínseca.

En condiciones de estrés, la célula produce estímulos de sobrevivencia y uno de ellos es la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2. Esta proteína se encuentra en citoplasma, retículo endoplásmico y membrana nuclear. Su función es prevenir la activación de caspasa-3 como respuesta a agentes que provocan apoptosis, bloqueando la liberación de cit C [48]. En ambas líneas celulares, se observó un incremento de alrededor del 6% en las células que fueron sometidas a los diferentes tratamientos, como respuesta ante un estado de estrés. Sin embargo, el aumento en la expresión de esta proteína no es suficiente para detener el proceso de apoptosis (activación de la caspasa-3 y liberación de cit C).

Por otra parte, la caspasa-8 que es una de las iniciadoras de la vía extrínseca de la apoptosis, se encuentra ausente en ambas líneas celulares. Este hecho refuerza la teoría de que las Casiopeínas no inhiben la proliferación celular mediante la vía mitocondrial. Cabe destacar que en el caso de la línea SK-N-SH, se ha reportado la deficiencia de la caspasa-8 [42]; mientras que en la línea CHP-212 no hay reporte alguno a favor o en contra. La falta de expresión de esta caspasa en ambas líneas celulares, puede tener su origen en diversos factores. Así, en un estudio *in vitro* de neuroblastoma, se detectaron bajos niveles de RNAm y la ausencia de la caspasa-8, en 13 de 18 líneas celulares [49]. Esta pérdida puede deberse a una delección en el gen que la codifica (2q33) o al silenciamiento epigenético (metilación en las regiones regulatorias). El resultado neto de la ausencia de la caspasa-8, es la proliferación del tumor, ya que ésta tiene actividad de supresor tumoral [49].

En base a estos resultados podemos concluir que la vía implicada en la actividad antiproliferativa de las Casiopeínas es la intrínseca, debido a la liberación del cit C desde la mitocondria, al incremento de Bcl-2 citoplásmico, con la entrada de Bax a la mitocondria, lo cual se observa como el decremento de esta proteína en el citosol además de la ausencia de la caspasa-8.

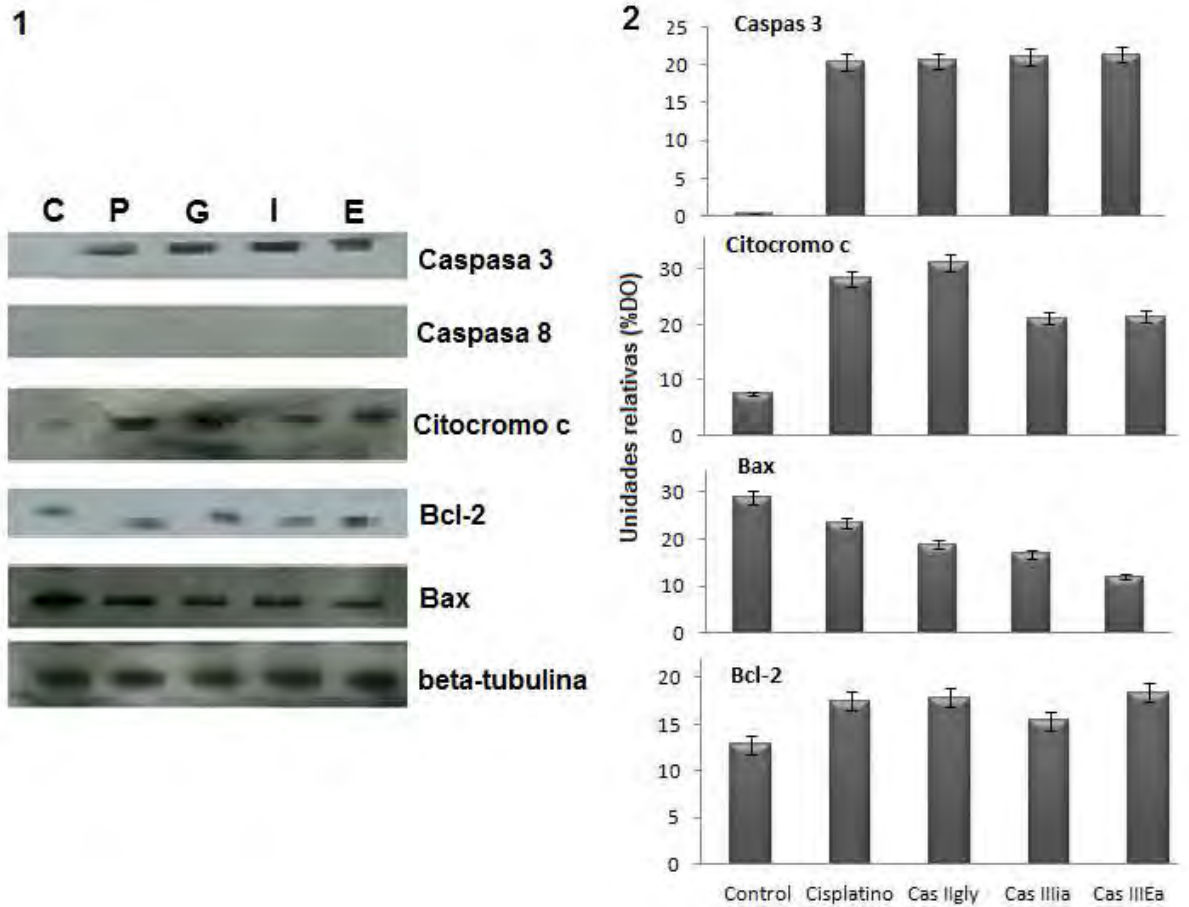


Figura 16. Expresión de proteínas apoptóticas para la línea CHP-212. 1) Western blot para caspasas activas -3 y -8, cit C, Bcl-2 y Bax. C=control (sin tratamiento), P=cisplatino, G=Cas IIgly, I=Cas IIIia, E=Cas IIIEa, las determinaciones se realizaron a las 2 h posteriores a la administración de la Cl_{50} correspondiente **2)** Porcentaje de expresión para cada molécula utilizando el programa ImageJ. En todos los casos se utilizó como control de carga β -tubulina. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes \pm DE.

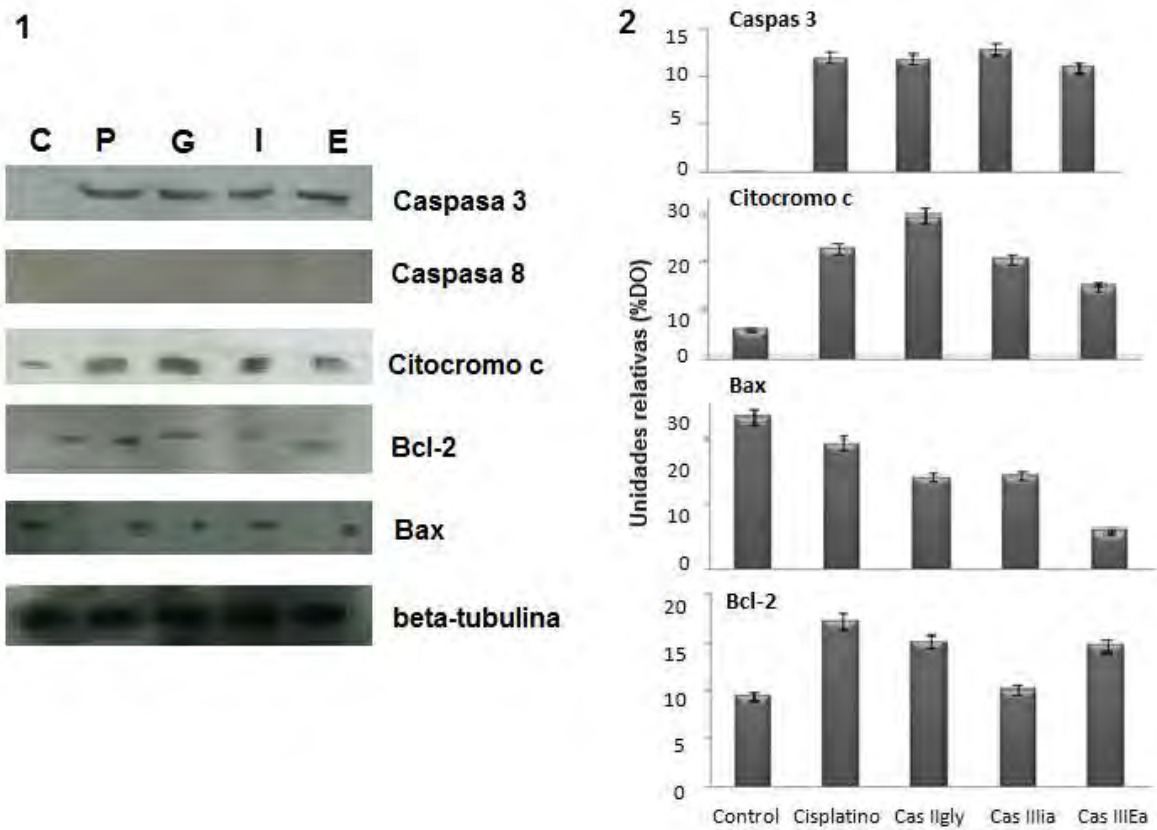


Figura 17. Expresión de proteínas apoptóticas para la línea SK-N-SH. 1) Western blot para caspasas activas -3 y -8, cit C, Bcl-2 y Bax. C=control (sin tratamiento), P=cisplatino, G=Cas IIgly, I=Cas IIIia, E=Cas IIIEa. Las determinaciones se realizaron a las 4 h posteriores a la administración de la CI_{50} correspondiente. **2)** Porcentaje de expresión para cada molécula utilizando el programa ImageJ . En todos los casos se empleó como control de carga β -tubulina. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes \pm DE.

Daño a la Membrana Mitocondrial

La mitocondria es el organelo central en el metabolismo energético, también actúa en la homeostasis de iones y en la regulación redox, por lo tanto, el daño a la mitocondria lleva a la muerte celular. Las células se sometieron a los tratamientos ya descritos y posteriormente se utilizó Mitotracker™, el cual es un tinte permeable a la membrana plasmática que difunde pasivamente dentro de las mitocondrias, acumulándose en aquellas con respiración activa. La fluorescencia de este colorante es directamente proporcional a las mitocondrias funcionales, lo que nos indica que una célula está viva o que se ha mantenido la integridad de las mitocondrias.

En la línea CHP-212 se observó que la actividad de las mitocondrias en ausencia del tratamiento es de 93.3%; mientras que para las células tratadas se obtuvo 86.5% para cisplatino, 87.5% en el caso de Cas IIgly, 72.5% para la Cas III Ea y 82.2% para la Cas IIIa. (Figura 18 A).

En el caso de la línea SK-N-SH, la actividad de las mitocondrias en ausencia de tratamiento fue de 86.3%, en tanto que para los tratamientos se obtuvo 75.5%, 66.5%, 69.2% y 70.1%, para cisplatino, Cas IIgly, Cas III Ea y Cas IIIa respectivamente (Figura 18 B).

En ambas líneas celulares se puede observar que en presencia de los tratamientos disminuye el porcentaje de mitocondrias activas; este decremento nos indica que el mecanismo mediante el cual las Casiopeínas inhiben la proliferación celular es causando un daño a la mitocondria. Esto se correlaciona con los resultados obtenidos al analizar diferentes moléculas apoptóticas, ya que con la liberación del cit C se altera la integridad membranal, lo que provoca la pérdida del potencial de membrana y como consecuencia la ausencia en la actividad mitocondrial. Este evento ya se ha reportado en células de meduloblastoma [18] y glioma C6 de rata después del tratamiento con Casiopeínas [19]. En el caso de la Cas IIgly se ha reportado que produce inhibición de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa (2-OGDH), la succinato deshidrogenasa (SDH) y la piruvato deshidrogenasa (PDH) mediante la interacción directa con los grupos sulfhidrilos de estas enzimas o con la coenzima A, interfiriendo de esta forma con la función mitocondrial. Este compuesto, a dosis mayores de 15 nmol (mg protein)⁻¹, provoca el incremento en la respiración mitocondrial, el cual se correlaciona con el hinchamiento de

la mitocondria dependiente de la apertura de los canales de potasio, seguida de una fuerte inhibición y la consecuente liberación de cit C [21].

El tratamiento que resultó tener el mayor efecto inhibiendo la actividad mitocondrial, fue la Cas IIIEa para la línea CHP-212 y la Cas IIgly para la SK-N-SH. Interesantemente, estas Casiopeínas corresponden a las que muestran la CI_{50} menor, es decir, a las que tienen mayor potencia inhibiendo la proliferación celular en cada línea celular, lo cual nos infiere nuevamente que en su mecanismo de acción está implicado el daño mitocondrial.

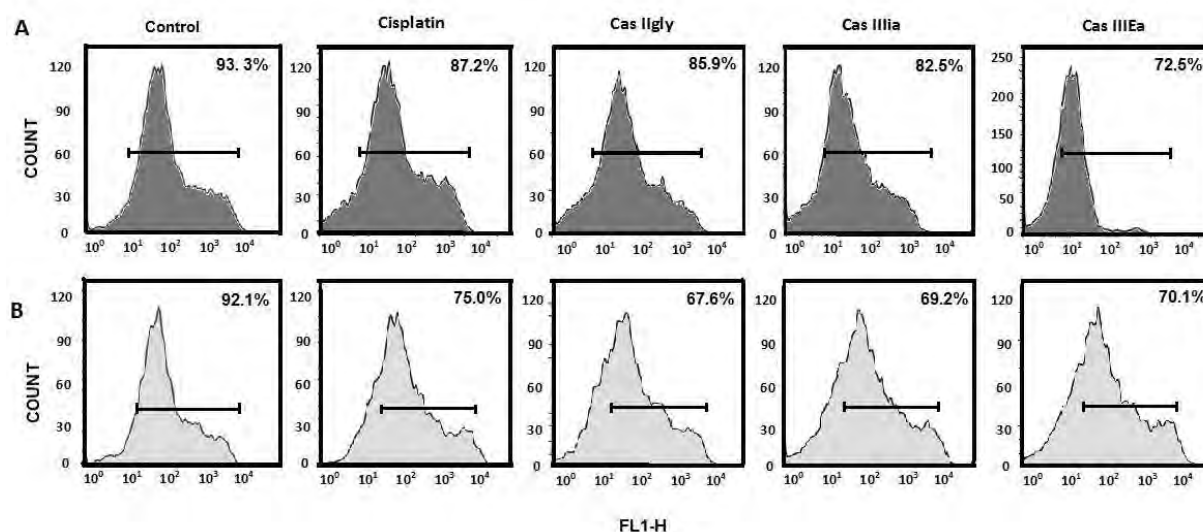


Figura 18. Disrupción de la membrana mitocondrial. Células teñidas con Mitotracker™ Green luego de administrar las CI_{50} de cisplatino, Cas IIgly, Cas IIIia y Cas IIIEa. En el eje “x” se midió la fluorescencia en el canal FL1-H y en el eje “y” el número de células (10,000 eventos por tratamiento). La determinación se realizó 2 h después del tratamiento para **A)** CHP-212 y 4 h para **B)** SK-N-SH. El valor de la esquina superior derecha corresponde al porcentaje de mitocondrias activas. Los resultados representan dos experimentos independientes.

Identificación del Radical Superóxido

El radical superóxido se produce cuando el oxígeno molecular acepta un electrón el cual queda desapareado; esto tiene lugar principalmente en las mitocondrias como consecuencia del metabolismo. El oxígeno recibe los electrones transportados, sin embargo, este mecanismo no es perfecto y entre el 1 y el 4% del oxígeno es convertido en EROs como el radical superóxido, en donde los compuestos antioxidantes actúan para mantener el balance redox, protegiendo de esta manera la homeostasis celular [39].

Se identificó el incremento de este radical como respuesta al tratamiento de Casiopeínas mediante el colorante MitoSox™ por citometría de flujo; en donde para la línea CHP-212 se observó un incremento de superóxido del 30-37%, siendo el porcentaje más alto el del tratamiento con Cas IIIEa (Figura 19 A). Mientras que para la línea SK-N-SH el incremento de superóxido fue de 14-21%, en donde el porcentaje mayor corresponde al cisplatino (Figura 19 B)

La síntesis de radical superóxido se incrementa mediante factores físicos como radiaciones y factores químicos como sustancias de abuso o fármacos. En este caso se determinó que el tratamiento con Casiopeínas aumenta la cantidad de radical superóxido, lo que promueve un ambiente oxidante el cual, si no es regulado mediante las defensas antioxidantes celulares, genera estrés oxidante y este es probablemente un factor que lleva a la célula a la muerte celular. Por otra parte se ha reportado que el radical superóxido es un inhibidor de FAS [50], por lo que su incremento en el NB posterior al tratamiento con Casiopeínas, podría estar implicado en: i) la inhibición de la vía extrínseca de la apoptosis originando una preferencia por la vía mitocondrial, ii) participando en la generación de otras EROs y iii) reaccionado con biomoléculas principalmente con el DNA mitocondrial y por consecuencia, con la muerte celular mitocondrial.

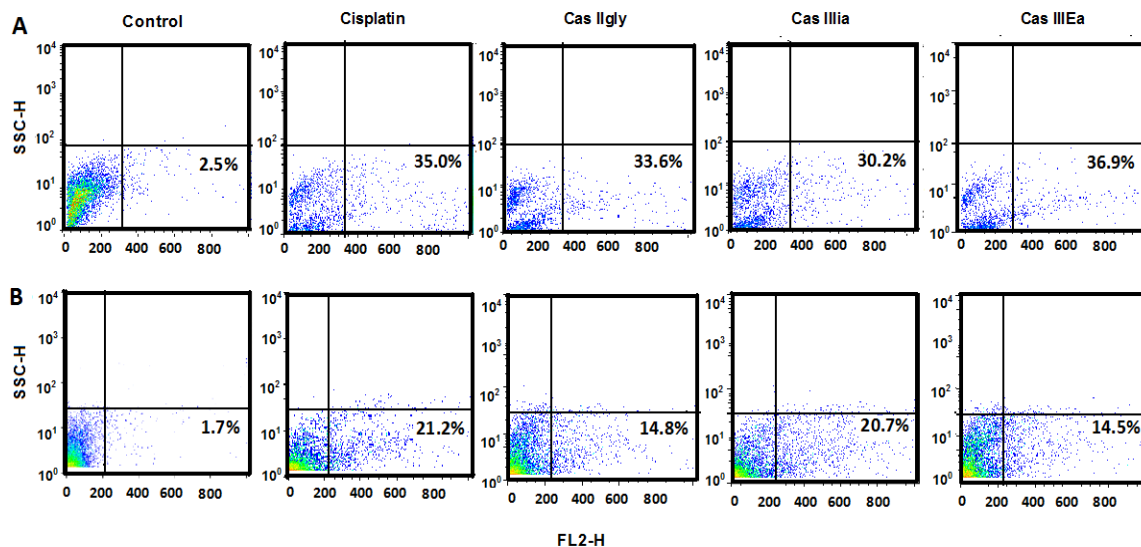


Figura 19. Identificación del radical superóxido por citometría de flujo. La determinación se realizó 2 h después del tratamiento para **A)** CHP-212 y 4 h para **B)** SK-N-SH. Se administró la CI_{50} correspondiente y se cuantificaron 10,000 eventos por tratamiento. El porcentaje del cuadrante inferior derecho corresponde al promedio del radical superóxido obtenido de dos experimentos independientes;

Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)

El peróxido de hidrógeno es una especie reactiva no radical, lo que lo hace menos reactivo que las especies radicales. Sin embargo, el daño celular que produce es muy elevado debido a que en su hidrólisis hay metales que actúan como catalizadores, especialmente el hierro y el cobre mediante la reacción de Fenton; esta catálisis ya se ha reportado para la Cas IIgly [19].

La determinación de H_2O_2 intracelular se realizó mediante AmplexRed™, en donde para ambas líneas celulares se observa un incremento de esta especie reactiva. De manera particular, en la línea CHP-212 (Figura 20A) el porcentaje de células con un incremento en H_2O_2 está en el intervalo de 14-27%, obteniendo el porcentaje más alto con el tratamiento de la Cas IIIia (26.6%). En tanto que para la línea SK-N-SH se observó un incremento del 20-34% en la producción de esta especie reactiva, obteniendo el mayor aumento con el tratamiento de cisplatino.

Una de las reacciones implicadas en la formación del H_2O_2 es mediante la enzima superóxido dismutasa (SOD) al reaccionar con el radical superóxido, por lo que los niveles intracelulares aumentados de radical superóxido (Figura 19) pueden contribuir al incremento intracelular de H_2O_2 (Figura 20). Por otra parte se ha reportado que el H_2O_2 a bajas concentraciones (100 μ M), induce una serie de eventos que incluyen cambios morfológicos celulares, fragmentación del DNA y activación de caspasas en líneas celulares de leucemia [50], por lo que el incremento de H_2O_2 posterior a la incubación con Casiopeínas puede estar implicado por una parte en la inducción de la apoptosis y por otra parte, como sustrato de la reacción de Fenton, la que tiene como producto al radical hidroxilo el cual es altamente reactivo, afectando a diferentes biomoléculas lo cual puede no solo causar un proceso apoptótico, sino también necrosis secundaria. El incremento de EROs promueve que el factor regulador P53 incremente el mensajero y la proteína Bax, lo cual está implicado en la liberación de cit C y por consecuencia en la activación de caspasa-3 [51, 52]. Así, el aumento de EROs desencadena un proceso apoptótico mediante la vía mitocondrial; por lo que podemos concluir que la ruta mediante la cual las Casiopeínas inhiben la proliferación celular es la intrínseca, siendo el incremento de EROs un factor inductor en este proceso.

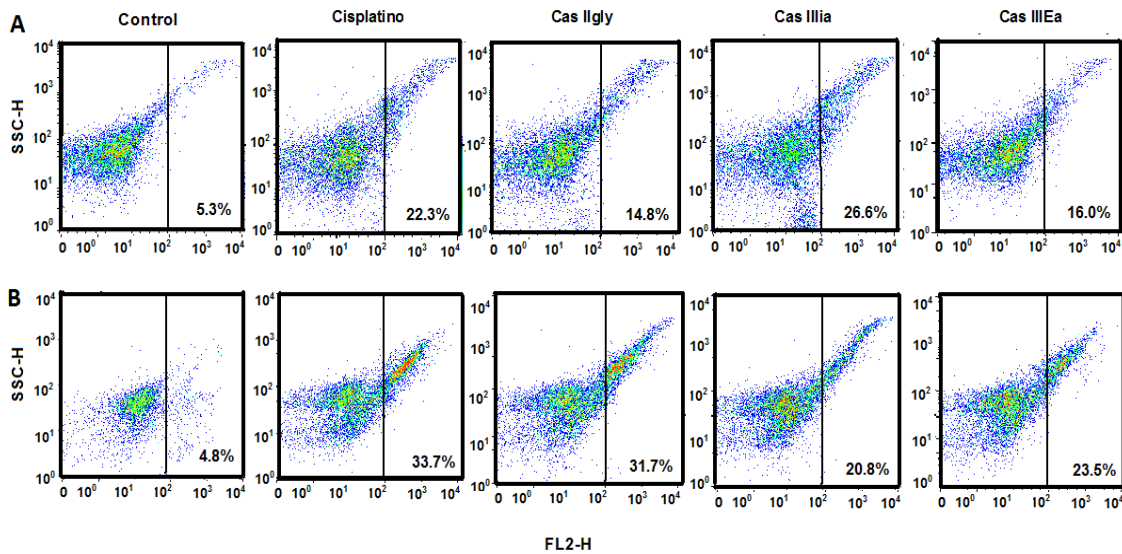


Figura 20. Determinación de H_2O_2 por citometría de flujo Las determinaciones se realizaron 2 h posteriores al tratamiento con las correspondientes CI_{50} de cisplatino, Cas IIgly, Cas IIIia y Cas IIIEa, para **A)** CHP-212 y 4 h para **B)** SK-N-SH. El porcentaje del cuadrante inferior corresponde al promedio de H_2O_2 como resultado de tres experimentos independientes. Se cuantificaron 10,000 eventos por tratamiento.

Glutación

Se midió el porcentaje intracelular de GSH con el colorante MCB que reacciona de manera selectiva formando un complejo que es determinado espectrofotométricamente. Se consideró como 100% de GSH intracelular, el obtenido en las células sin tratamiento. En la línea CHP-212, se observó que la cantidad de GSH intracelular después de dos horas de tratamiento, fue de 67% para la Cas IIgly, 77% para la Cas IIIia y 64% para la Cas IIIEa; mientras que para el cisplatino se obtuvo un 34% (Figura 21). En el caso de la línea SK-N-SH después de cuatro horas de tratamiento, la cantidad de GSH intracelular fue de 64, 71 y 79% para las Cas IIgly, IIIia y IIIEa respectivamente, en tanto que para el cisplatino fue de 29% (Figura 21).

Estos resultados muestran que hay una alteración en los niveles intracelulares de GSH. Para mantener las concentraciones basales de GSH dentro de la célula, la enzima glutación reductasa (GRd), reduce el GSSG (glutación oxidado) a GSH [33]. El decremento de GSH intracelular está relacionado con la



producción de EROs, ya que el grupo sulfhidrilo en la estructura del GSSG, es el encargado de atrapar a las especies reactivas formando un enlace covalente

coordinado con el metal, reduciendo el GSH a través de una reacción de sustitución nucleófila a GSSG. El platino es un metal blando que tiene afinidad por donadores blandos como el grupo cisteína del glutatión, esta unión es el mecanismo mediante el cual las células eliminan al cisplatino. Este proceso está implicado en los bajos niveles de GSH detectados en ambas líneas celulares después del tratamiento con cisplatino, ya que al eliminarse el cisplatino unido al GSSG, impide que la GRd regenere los niveles basales de GSH. Este efecto ha sido reportado en diversas líneas celulares neoplásicas después del tratamiento con cisplatino [19, 43].

En el caso del Cu (que es el metal que conforma a las Casiopeínas), se ha reportado que puede reaccionar con el GSH y formar complejos estables; sin embargo, aún se desconoce si éste es el mecanismo de eliminación de las Casiopeínas o si éstos complejos interfieren con el proceso de regeneración del GSH [44]. El decremento en los niveles intracelulares de GSH posterior al tratamiento con Casiopeínas, se ha reportado en melanoma murino y cáncer pulmonar con la Cas IIgly, como resultado de que la Casiopeína cataliza la reacción de Fenton y el GSH actúa atrapando a las ROS producidas [44]. La disminución intracelular de GSH en el NB después del tratamiento con las Cas IIgly, IIIa y IIIEa es consecuencia de un ambiente prooxidante (Figuras 19 y 20), por lo que el estrés oxidante causado por las Casiopeínas implica un incremento de EROs y una disminución de antioxidantes, lo que desencadenan la muerte celular.

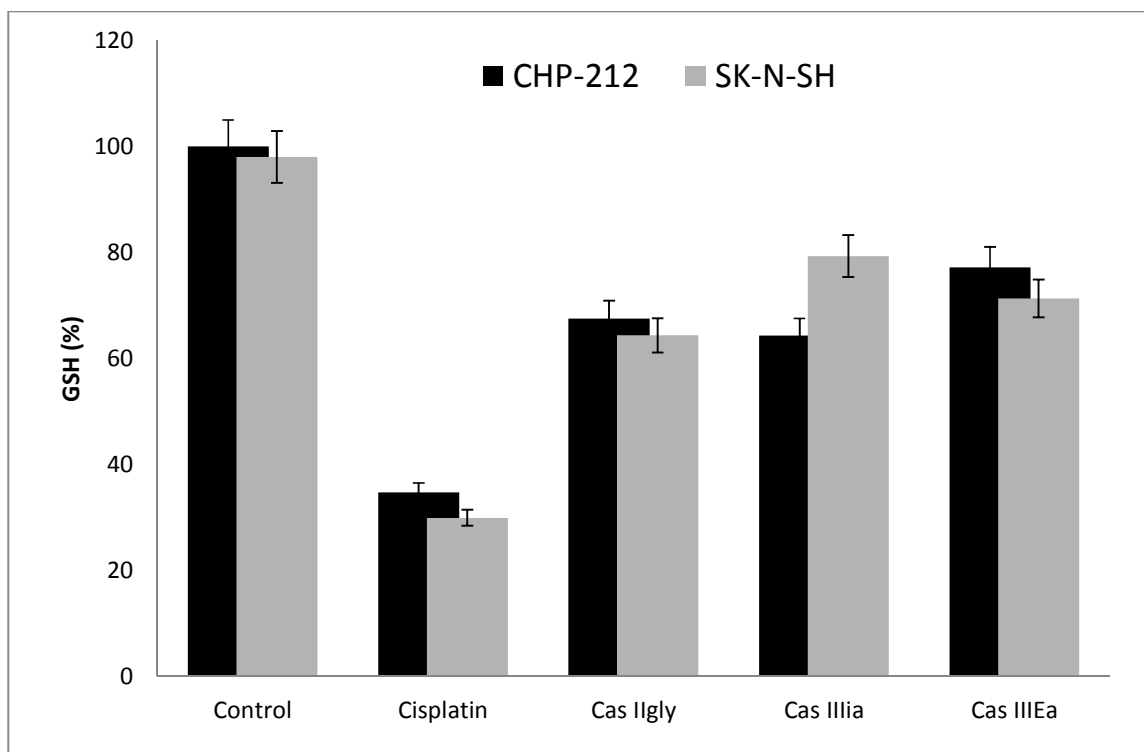


Figura 21. Concentración porcentual intracelular de glutatión. Luego de la administración de las correspondientes IC_{50} , se realizó la determinación de glutatión a las 2 h para CHP-212 y a las 4 h para SK-N-SH. Se cuantificaron 10,000 eventos por tratamiento y el control representa el 100% de GSH (células sin tratamiento). Resultados obtenidos de tres experimentos independientes \pm DE.



En los resultados obtenidos en las líneas celulares neuroblásticas CHP-212 y SK-N-SH, se demostró la capacidad de inhibición de la proliferación de los compuestos de coordinación de Cobre (II) Cas IIgly, Cas IIIia y Cas IIIEa. Todos ellos han demostrado un aumento en la potencia de inhibición de la proliferación celular de 5 a 12 veces más, con respecto al cisplatino (medicamento utilizado en la quimioterapia del neuroblastoma). Esta mayor potencia antiproliferativa de las Casiopeínas también se ha visto en las líneas celulares tumorales humanas HeLa, A549, H157, Daoy y HCT 15, así como en el glioma C6 murino, en donde la citotoxicidad se asocia principalmente a la sobreproducción de ROS.

En el caso del NB, la mayor eficacia de los compuestos fue hallada con la Cas IIIEa para la línea CHP-212 y la Cas IIgly para las células SK-N-SH. La citotoxicidad de estos compuestos de coordinación de Cobre (II) tiene la siguiente secuencia: CasIIIEa> CasIIgly> CasIIIia para la línea CHP-212; mientras que para línea SK-N-SH es CasIIIEa> CasIIIia> CasIIgly. Como se predijo por los estudios QSAR, aquellos compuestos con fenantrolina son más potentes para inhibir la proliferación de células que los derivados de bipyridina; del mismo modo, los compuestos de acetilacetato han demostrado valores de CI_{50} inferiores que aquellos con glicina.

Todos los compuestos de cobre han demostrado un agotamiento del GSH intracelular, aumento de peróxido de hidrógeno y superóxido, el aumento de los marcadores de apoptosis caspasa-3, cyt C y Bax, la ausencia de caspasa-8 y la disminución porcentual de mitocondrias activas; lo que sugiere que las Casiopeínas tienen una actividad anticancerígena en el neuroblastoma con un fuerte ambiente pro-oxidante seguido de apoptosis mitocondrial.

La notable actividad citotóxica que estos compuestos han mostrado contra el neuroblastoma (CHP-212 y SK-N-SH) es inducida a través de la vía apoptótica intrínseca, hecho que propone a las Casiopeínas como buenos candidatos para realizar estudios adicionales en los sistemas tumorales que responden pobremente a los esquemas terapéuticos actuales.



10. CONCLUSIONES

La vía apoptótica preferencial en el Neuroblastoma por el tratamiento con Casiopeínas es la intrínseca, debido a la ausencia de caspasa-8, la expresión de caspasa-3, con liberación mitocondrial de cit C, seguido de un aumento citoplásmico de Bcl-2 y la entrada de Bax a la mitocondria, concomitantemente con la liberación de H_2O_2 y O_2^- , creando un microambiente favorable para la apoptosis.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Park, J.R., A. Eggert, y Caron H., *Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment*. *Pediatr Clin North Am*, 2008, **55**(1): p. 97-120.
2. Nuchtern, J. G., Russell, H. V. y Shohet, J. M. *Neuroblastoma. Adrenal glands*. Springer Berlin Heidelberg. 2005: p.211-222.
3. Bénard, J., Raguénez, G., Kauffmann, A., Valent, A., Ripoche, H., Joulin, V., Job, B., Danglot, G., Cantais, S. y Robert, T. *MYCN-non-amplified metastatic neuroblastoma with good prognosis and spontaneous regression: A molecular portrait of stage 4S*. *Molecular Oncology*, 2008, **2**:p. 261-271.
4. Seeger, R. C, Brodeur, G. M., Sather, H., Dalton, A., Siegel, S. E., Wong, K. Y. y Hammond, D. *Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas*. *New England Journal of Medicine*, 1985, **313**:p. 1111–1116.
5. Attiyeh, E. F., London, W.B., Mosse, Y. P., Wang, Q., Winter, C. y Khazi, D. *Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma*. *New England Journal of Medicine*, 2005, **353**:p. 2243–2253.
6. Shimada, H., Chatten, J., Newton, W. A., Sachs, N., Hamoudi, A. B. y Chiba, T. *Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas*. *Journal of the National Cancer Institute*, 1984, **73**: p. 405–416.
7. Hoyos-Muñoz A, Bonilla-Pérez E, Santana-Delgado R, Molina-Font JA. *Neuroblastoma*. En: *Oncología infantil*. Asociación Alcalá. 2007, p. 103-128
8. Shimada, H., Ambros, I. M., Dehner, L. P., Hata, J-i., Joshi, V. V. y Roald B. *Terminology and morphologic criteria of neuroblastoma tumors* *Cancer*, 1999, **83**:p. 349-363.
9. Biedler, J. L., Lazarova, D. L., Ross, R. A. y Spengler, B. A. *Cell lineage and differentiation state are primary determinants of MYCN gene expression and malignant potential in human neuroblastoma cells*. *Oncology Research* 1997, **9**: p. 467:476.
10. Juárez-Ocaña, S., Palma-Padilla, V., González-Miranda, G., Siordia-Reyes, A. G., López-Aguilar, E., Aguilar-Martínez, M., Mejía-Aranguré, J. M., Carreón-Cruz, R., Rendón-Macías, M. E. y Fajardo-Gutiérrez, A. *Epidemiological and some clinical characteristics of neuroblastoma in Mexican children*. *BMC Cancer*, 2009, **9**: p. 266
11. Owens C, Irwin M, *Neuroblastoma: the impact of biology and cooperation leading to personalized treatments*, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2012, **49**(3) p: 85-115.
12. Sung KW, *Treatment of high-risk neuroblastoma*, 2012, **55** (4) p:115-120.



13. Ebb DH, Green DM, Shamberger RC, Tarbell NJ. *Solid tumors of childhood. In: Cancer principles and practice of oncology 7th edition*. De Vita Jr. Hellman S, Rosenbreg SA. Lippincott Williams & Wilkins. 2005. Philadelphia, USA
14. Sheikh-Hamad D, Timmins K y Jalali Z. *Cisplatin-induced renal toxicity: possible reversal by N acetylcysteine treatment*. Journal of the American Society of Nephrology. 1997. **8**:p. 1640-1644.
15. Slattery EL y Warchol ME. *Cisplatin ototoxicity blocks sensory regeneration in the aviar inner ear*. Journal Neurosciens. 2010. **30**:p. 3473-3481.
16. Ruiz Azuara, L., Patente, Enero 26, (1994) no. 172967; SECOFI 18802. P. I. (1990). Patente Dic.9 (1993) no. 172248; US Patent Ap 21 (1992) Number 5, 107, 005. Re35, 458, Feb. 18 (1997); U. S. Patent Pat. No. 5,576,326. Nov. 19 (1996) [®Trade Mark: Casiopeína. Reg. 407543 SECOFI (1992), renewal (2002), (2012)].
17. Carvallo-Chaigneau F, Gómez-Ruiz C, Rodríguez-Aguilera E, Macías-Rosales L, Cortés-Barberena E., Cedillo-Peláez C, Gracia-Mora I, Ruiz-Azuara L, Madrid-Marina V y Constantino-Casas F, *Casiopeína III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumoreffect in vivo*. BioMetals, 2007 **1**:p.17-28.
18. Mejia, C. and L. Ruiz-Azuara, *Casiopeínas IIgly and IIIia induce apoptosis in medulloblastoma cells*. Pathology Oncology Research, 2008. **14**(4):p. 467-472.
19. Trejo-Solís C, Palencia G, Zúñiga S, Rodríguez-Ropony A, Osorio-Rico L, Sanchez L, Gracia-Mora I, Marquez-Rosado L, Sánchez A, Moreno-García ME, Cruz A, Bravo-Gómez ME, Ruiz-Ramírez L, Rodríguez-Enriquez S y Sotelo J, *Cas IIgly Induces Apoptosis in Glioma C6 Cells In Vitro and In Vivo through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms*, Neoplasia, 2005, **7**(6):p. 563–574.
20. Kachadourian, Brechbuhl HM, Ruiz-Azuara L, Gracia-Mora I y Day BJ, *Casiopeína IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells*. Toxicology, 2010. **268**(3):p. 176-183.
21. Marin-Hernandez, Gracia-Mora, Ruiz-Ramírez, Moreno-Sánchez, *Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas) on mitochondrial functions*. Biochemical Pharmacology, 2003. **65**(12): p. 1979-1989.
22. Bodeur, M., *Neuroblastoma: Biological Insights into a clinical enigma*. Nature Reviews, 2003. **3** p: 203-216
23. Hill, M.M., C. Adrain, and S.J. Martin, *Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows*. Molecular Interventions, 2003. **3**(1): p. 19-26.
24. Mognotte, B., *Mitochondria and apoptosis*. European Journal of Biochemistry, 1998. **53**:p. 201-214.
25. Kaufmann, S., *cell death induced by topoisomerase-targeted rugs: more questions than answers*. Biochimica Biophysica Acta, 1998. **1400**: p. 195-211.



26. Robertson, J. y S. Orrenius, *Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals* Clinical Review Toxicology, 2000. **30**: p. 609-627.
27. Oehm A., Iris Behrmann S, Werner F., Pawlitan M., Maier G., Klas C., Li-Weber M., Richards S., Dhein J., Bernhard C. Trauth S, Ponstingl H., y Krammer P., *Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen.* Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(15): p. 10709-10715.
28. Fulda, S. y K.M. Debatin, *Apoptosis pathways in neuroblastoma therapy.* Cancer Letters, 2003. **197**(1-2): p. 131-135.
29. Kaufmann, M., Bozic D, Briand C, Bodmer JL, Zerbe O, Kohl A, Tschopp J y Grütter MG. *Identification of a basic surface area of the FADD death effector domain critical for apoptotic signaling.* FEBS Letters, 2002. **527**(1-3): p. 250-254.
30. Sheikh, M.S. and Y. Huang, *Death receptor activation complexes: it takes two to activate TNF receptor 1.* Cell Cycle, 2003. **2**(6): p. 550-552.
31. Castedo M., Ferri K., Roumier T., Métivier D., Zamzami N., Kroemer G., *Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis.* Journal Immunology Methods, 2002. **265**(1-2): p. 39-47.
32. Logue, S.E. y S.J. Martin, *Caspase activation cascades in apoptosis.* Biochemical Society Transactions, 2008. **36**(Pt 1): p. 1-9.
33. Circu, M.L. y T.Y. Aw, *Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis.* Free Radicals Biology and Medicine, 2010. **48**(6): p. 749-762.
34. Davies, K.J., *Oxidative stress: the paradox of aerobic life.* Biochemical Society Symposia, 1995. **61**: p. 1-31.
35. Marengo B, Raffaghello L., Pistoia V., Cottalasso D., Pronzato M., Marinari U., Domenicotti C., *Reactive oxygen species: biological stimuli of neuroblastoma cell response.* Cancer Letters, 2005. **228**(1-2): p. 111-116.
36. Pierce, G.B., R.E. Parchment, y A.L. Lewellyn, *Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst.* Differentiation, 1991. **46**(3): p. 181-186.
37. Roos Cuperus, R.L., Godelieve A. M. Tytgat, Huib N. Caron, André B. P. y van Kuilenburg., *Fenretinide induces mitochondrial ROS and inhibits the mitochondrial respiratory chain in neuroblastoma.* Cellular and Molecular Life Sciences, 2010 (67): p. 807-816.
38. Wagener, F.A., Dekker D, Berden JH, Scharstuhl A, y van der Vlag J. *The role of reactive oxygen species in apoptosis of the diabetic kidney.* Apoptosis, 2009. **14**(12): p. 1451-1458.
39. Halliwell B., Gutteridge J., *Free radicals in biology and Medicine*, fourth edition, Biociencias, 2007: p. 80.



40. Mejía C., Navarro S. and Llombart-Bosch A., *Apoptosis in peripheral neuroblastic tumors. Immunohistochemical expression of bcl-2 and p53 is related to DNA fragmentation*, *Histology and Histopathology*, 2007, **22**: p. 1365-1370
41. Gutiérrez A., Ruiz L., Mejía C., *Análisis de la apoptosis en el neuroblastoma por efecto de Casiopeínas®*, II congreso Nacional de Innovación en la Salud y Química Médica 13-16 abril 2011, Red Temática de Investigación Desarrollo de Fármacos y Métodos Diagnósticos.
42. Zauli G, Milani D, Rimondi E, Baldini G, Nicolini V, Grill V, Secchiero P, *TRAIL activates a caspase 9/7-dependent pathway in caspase 8/10-defective SK-N-SH neuroblastoma cells with two functional end points: induction of apoptosis and PGE2 release*. *Neoplasia*. 2003;**5**(5): p.457-466.
43. Alemón-Medina R., Bravo-Gómez M., Gracia-Mora M., Ruiz-Azuara L., *Comparison between the antiproliferative effect and intracellular glutathione depletion induced by Casiopeína IIgly and cisplatin in murine melanoma B16 cells*. *Toxicology in Vitro*, 2011, **25**(4): p. 868-873.
44. Arnér E., nakamura H., tetsuro S., junji Y., arne holmgren, and Giannis S.; *analysis of the inhibition of mammalian thioredoxin, Thioredoxin reductase, and glutaredoxin by Cis-diamminedichloroplatinum (ii) and its major metabolite, The glutathione-platinum complex*. *Free Radical Biology & Medicine*, 2001, **31**(10), p: 1170–1178.
45. Cai J, Yang J, Jones DP; *Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, **1366** (1-2), p: 139-149.
46. Hengartner MO; *The biochemistry of apoptosis*, *Nature*, 2000, **407**(6805), p:770-776.
47. Leung LK and Wang TT, *Differential effects of chemotherapeutic agents on the Bcl-2/Bax apoptosis pathway in human breast cancer cell line MCF-7*, *Breast Cancer Research and Treatment*, 1999, 55 pp. 73–83.
48. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD, *The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis*, *Science*, 1997, **1133** (275), p: 1132-1136
49. Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, y Kidd VJ, *Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN*. *Nature Medicine*, 2000, 6, p: 529-535.
50. Matura T, Kai M, Fujii Y, Ito H and Yamada K. *Hydrogen Peroxide-induced apoptosis requires Caspase-3 activation in HL-60 Cells*; *Free Radical Research*, 1998,**30**, p. 73-83.
51. Watcharasit P, Suntararuks S, Visitnonthachai D, Thiantanawat A and Satayavivad J. *Acrylonitrile induced apoptosis via oxidative stress in neuroblastoma SH-SY5Y cell*, *applied toxicology*, 2009, **30**(7): p. 649-655.
52. Zhou LJ and Zhu XZ, *Reactive Oxygen Species-Induced Apoptosis in PC12 Cells and Protective Effect of Bilobalide*, *the journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 2000, 293(3): p.982–988.



53. Chavez Georgina, Trejo-Solis C, Jimenez M. Tesis Maestria *Efecto antineoplásico y mecanismos de acción del compuesto de coordinación Cas IIIa sobre el carcinoma de células escamosas orales humanas in vitro*, 2012.